



Les triterpénoïdes chez la vigne : quantifications, voies de biosynthèse et intérêt pour la lutte contre des bioagresseurs

Flora Pensec

► To cite this version:

Flora Pensec. Les triterpénoïdes chez la vigne : quantifications, voies de biosynthèse et intérêt pour la lutte contre des bioagresseurs. Sciences agricoles. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2013. Français. NNT : 2013MULH8854 . tel-01387389

HAL Id: tel-01387389

<https://theses.hal.science/tel-01387389>

Submitted on 25 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Haute Alsace

Domaine : Sciences de la vie

Flora Pensac



Les triterpénoïdes chez la vigne: quantifications, voies de biosynthèse et intérêt pour la lutte contre des bioagresseurs

Soutenance publique le 25 novembre 2013 devant le jury composé de :

Olivier Lemaire	Directeur de recherche INRA, Colmar	Rapporteur
Patrice Rey	Professeur Bordeaux Sciences Agro	Rapporteur
Céline Tarnus	Professeur – UHA	Examineur
Hubert Schaller	Directeur de recherche CNRS-Unistra	Examineur
Axel Marchal	Maître de Conférences – ISVV Bordeaux	Membre invité
Julie Chong	Maître de Conférences HDR – UHA	Co-directrice de thèse
Christophe Bertsch	Professeur – UHA	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Merci à Patrice Rey et Olivier Lemaire d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail ainsi que Hubert Schaller, Céline Tarnus et Axel Marchal pour leur participation à ce jury.

Merci à Christophe et Julie, mes directeurs de thèse, de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidée tout en me laissant prendre le sujet en main. Christophe, tu m'as montré l'importance des collaborations, de la communication, c'est une leçon que je garderai pour ma future carrière. Julie, merci pour tes conseils, et ta disponibilité tout au long de cette thèse. Merci à vous de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux à l'International Congress of Plant Pathology de Pékin, une expérience angoissante mais très formatrice !

Merci au personnel administratif, aux membres de l'école doctorale et au service enseignement de l'Université d'avoir accepté de me confier des charges d'enseignement. J'ai énormément pris plaisir à préparer et encadrer les cours, TD, TP ces trois années. Je suis ravie de poursuivre cette expérience pour mon ATER.

Merci Carmen pour les discussions sympas entre midi et deux, et ta disponibilité pour l'organisation des emplois du temps. Merci Yann pour ton aide lors des préparations de TP, j'ai pris plaisir à apprendre à tes côtés et à partager les pauses sous le signe de la bonne humeur.

Merci aux membres de l'équipe MCV, Flore, Sibylle, Hélène, Mélanie. J'ai finalement grandi à vos côtés et beaucoup appris de toutes ces discussions dans le bureau ou entre deux portes !

Merci aux membres du laboratoire, Marc qui m'a bien aidée à dompter R, Karine, Isabelle, Pascale, Laurence, Laure, Bernard et Paul, quel plaisir d'échanger avec toi sur des sujets allant de la fabrication du cidre à la taille des gratte ciels de Shanghai !

Merci à tous mes collègues doctorants, post doctorants passés ou présents : Montserrat, Salwa, Karine, Sylvain ; merci à Frédéric, Noémie, Camille, Juan et Sébastien avec qui j'ai passé mes pauses et découvert des sites internet incroyables !

Merci aux personnes avec qui j'ai collaboré : l'équipe RITMO avec Laurent, Audrey et Najat ; Max Henry grâce à qui j'ai été formée à la chimie et j'ai découvert des équipements extraordinaires ; Marc et Sophie pour les discussions et manip autour des triterpène synthèses ; Gérard et Aurélie pour les manipulations et les discussions sur les nématodes. Merci Axel pour ta grande aide, ta disponibilité et les échanges très fructueux que nous avons eus et qui continueront, je l'espère.

Merci à tous ceux qui m'ont transmis la passion des plantes et de la phytopathologie.

Merci à tous mes amis qui ont, de près ou de loin, suivi mes aventures dans le grand Est. Seb et Isa, mes edelweiss ; la fine équipe de l'école d'ingénieur horticole à Angers : Marie, Alice, Caroline et Baptiste ; Marie mon cosmos chocolat qui me suit depuis la prépa à Nantes. Merci Constance, le regard, comme moi, tourné vers le large, comme un pompon de bord de mer.

Merci à ma famille d'avoir semé en moi la force des rêves et de m'avoir donné les moyens de les voir fleurir. Vous m'avez soutenue tout en me laissant pousser dans mon propre jardin.

Merci Guillaume, mon mari, de m'avoir suivie lorsque je t'ai annoncé que je démarrais une thèse à Colmar, et de m'apporter un soutien sans faille. Cette phrase écrite par Alexandre Dumas dans le Comte de Monte Cristo résume tout : « Ils avaient poussé l'un à côté de l'autre comme deux arbres qui mêlent leurs racines sous le sol, leurs branches dans l'air, leur parfum dans le ciel ». De nombreuses aventures nous attendent encore.

Liste des abréviations

ACC : Acide 1-AminoCyclopropane-1-Carboxilique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ArMV : *Arabidopsis mosaic virus*

ARN : Acide RiboNucléique

Avr : Protéine d'avirulence

BDA : Black Dead Arm

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI50: Concentration inhibitrice à 50%

DCCC : Droplet Counter Current Chromatography

DMAPP : DiMethylallyl diPhosphate

dNTP : désoxyriboNucléotides triPhosphate

EDTA: Ethylene DiamineTetraacetic Acid

EST : Expressed Sequence Tag

ET : Ethylène

ETI : Effector-Triggered Immunity

ETS : Effector-Triggered Susceptibility

FPP : Farnesyl diphosphate

GC-MS : Gas Chromatography - Mass Spectrometry

GFLV : Grapevine fanleaf virus

GLRaV : *Grapevine leafroll-associated virus*

GPP : Geranyl diPhosphate

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HR : Hypersensitive Response

iPCR : inverse PCR

IPP : Isopentenyl diPhosphate

ISR : Induced Systemic Resistance

JA : Jasmonic Acid

JA-Ile : (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine

LAR : Localized Acquired Resistance

LB : Luria Bertani

LC-FTMS : Liquid Chromatography Fourier Transform Mass Spectrometry

LD50 : Lethal Dose 50

LMR : Limite Maximale de Résidus
LSD : Least Significant Difference
MAP : Mitogen Activated Protein
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NB-LRR : Nucleotide Binding – Leucine Rich Repeat
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NPR1 : Non expressor of Pathogenesis Related Protein 1
OSC : OxydoSqualène Cyclase
PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
PCR : Polymerase chain Reaction
PDA : Potato Dextrose Agar
PR : Pathogenesis Related
PRRs : Pattern Recognition Receptors
PTI : PAMPs-triggered immunity
qPCR : quantitative PCR
RACE-PCR: Rapid Amplification of cDNA Ends PCR
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Reactive Oxygen Species
RT-PCR : Reverse Transcription PCR
SA : Salicylic Acid
SAR : Systemic Acquired Resistance
SAU : Surface Agricole Utile
TAE : Tris Acétate EDTA
T_m : Température de fusion
TPS : Triterpène Synthase
UGT : Uridine diphosphate GlycosylTransferase
UTR : UnTranslated Region

REMERCIEMENTS

2

LISTE DES ABREVIATIONS 6

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE..... 18

Introduction générale 19

1. La vigne, une espèce soumise à de nombreuses pressions parasitaires 24

1.1	Principales maladies cryptogamiques de la vigne	24
1.1.1	Anthraxnose	24
1.1.2	Excoriose	24
1.1.3	Black rot	24
1.1.4	Mildiou	26
1.1.5	Oïdium	28
1.1.6	Pourriture grise	30
1.1.7	Maladies du bois	32
1.2	Maladies à phytoplasme et leurs vecteurs	40
1.2.1	Maladie du bois noir	40
1.2.2	Flavescence dorée	40
1.3	Maladies à virus économiquement importantes et leurs vecteurs	42
1.3.1	Maladie de l'enroulement	42
1.3.2	Maladie du court-noué	42

2. Les réponses des plantes face aux agressions parasitaires 48

2.1	Coévolution entre les plantes et leurs bioagresseurs	48
2.2	Reconnaissance des agents pathogènes	48
2.2.1	Résistance non spécifique : PAMP-triggered immunity	49
2.2.2	Résistance spécifique : Effector-triggered immunity	50
2.2.3	Résistances locales et systémiques mises en place par la plante	52
2.3	Événements précoces de signalisation	54
2.3.1	Modification des flux ioniques	54
2.3.2	Production d'espèces activées de l'oxygène	54
2.3.3	MAP kinases	56
2.4	Signaux secondaires de nature hormonale	58
2.4.1	Acide salicylique : rôle et voies de biosynthèse	58
2.4.2	Acide jasmonique et éthylène: rôles et voies de biosynthèse	58
2.4.3	Interconnexions et régulations entre les différentes voies hormonales et autres phytohormones	60
2.5	Expression de la résistance	62
2.5.1	Renforcement des parois cellulaires	62
2.5.2	Protéines « Pathogenesis Related »	64
2.6	Activation du métabolisme secondaire	66
2.6.1	Métabolisme des phénylpropanoïdes	68
2.6.2	Métabolisme des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes	74
2.6.3	Métabolisme des triterpénoïdes	76

3. Vers l'utilisation de moyens de lutte respectueux de l'applicateur et de l'environnement 90

3.1	Prédominance de la viticulture conventionnelle au XXe siècle : état des lieux	90
3.2	Contexte de limitation des produits phytosanitaires	92

3.3	Concepts théoriques de raisonnement des traitements en viticulture	92
3.4	Méthodes alternatives testées ou utilisées contre les maladies de la vigne	96
3.4.1	Stimulation des défenses naturelles	96
3.4.2	Lutte biologique	98
3.4.3	Création d'hybrides	100
3.4.4	Transgénèse chez la vigne	102
3.4.5	Utilisation de molécules issues de plantes.....	106
3.5	Les saponines en tant que traitement permettant de lutter contre une large gamme d'agents pathogènes, un avenir pour la viticulture ?	106
4.	Objectifs de la thèse et stratégie de recherche	112
CHAPITRE 1 : IDENTIFICATION DE TRITERPENOÏDES CHEZ LA VIGNE		116
1.	Introduction.....	118
2.	Identification et quantification de triterpénoïdes à la surface des baies et des feuilles de différents cépages de vigne	119
2.1	Identification des triterpénoïdes à la surface des baies de différents cépages de vigne et suivi de l'évolution de leurs teneurs.....	120
2.1.1	Etat des lieux des connaissances sur la composition en triterpénoïdes des baies	120
2.1.2	Evolution des teneurs générales en triterpénoïdes et en acide oléanolique, composé majoritaire de la cire des baies	122
2.1.3	Evolution des teneurs en triterpénoïdes non majoritaires et comparaison des cépages	123
2.2	Identification des triterpénoïdes à la surface des feuilles de différents cépages de vigne	126
3.	Recherche de saponines chez la vigne.....	130
3.1	Extraction et la séparation des différentes familles de composés	130
3.2	Identification des composés majoritaires observés	132
Publication n°1 : Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids.		136
CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION ET ETUDE D'EXPRESSION DE GENES CODANT DES TRITERPENE SYNTHASES CHEZ LA VIGNE		138
1.	Introduction.....	140
2.	Identification et phylogénie des gènes codant des triterpène synthases candidates chez la vigne.....	141
2.1	Identification et positionnement des gènes codant des triterpène synthases candidates dans le génome de la vigne.....	142
2.2	Phylogénie des gènes codant des triterpène synthases candidates de la vigne	142
3.	Expression des gènes codant des triterpène synthases candidates chez la vigne	146
3.1	Comparaison de l'expression des <i>VvTPS</i> dans différents organes	146
3.2	Comparaison de l'expression des <i>VvTPS</i> dans les feuilles de différents cépages.....	148
3.3	Effet de stress biotiques et abiotiques sur l'expression de gènes codant des triterpène synthases candidates.....	150
3.3.1	Effet d'un stress biotique sur l'expression des <i>VvTPS</i>	150
3.3.2	Effet d'un stress abiotique sur l'expression des <i>VvTPS</i>	152

CHAPITRE 3 : UTILISATION DES SAPONINES POUR LUTTER CONTRE DES AGENTS PATHOGENES DE LA VIGNE156

1. Introduction..... 158

2. Utilisation de saponines pour lutter contre des agents pathogènes fongiques de la vigne..... 158

2.1 Test d'efficacité des saponines contre *Botrytis cinerea* 158

2.2 Test d'efficacité des saponines contre différents agents fongiques associés aux maladies du bois. 162

2.2.1 Efficacité des saponines issues de *Quillaja saponaria* sur des champignons associés aux maladies du bois 162

2.2.2 Efficacité des saponines issues de *Gypsophila paniculata* sur des champignons associés aux maladies du bois..... 164

2.2.3 Comparaison de l'efficacité des saponines issues de *Quillaja saponaria* et *Gypsophila paniculata* pour lutter contre des champignons des maladies du bois 166

2.3 Détoxification des saponines par les agents fongiques 166

2.3.1 Identification d'une saponinase candidate chez les champignons d'intérêt associés aux maladies du bois 166

2.3.2 Etude de l'expression de la β -glucosidase candidate identifiée chez des souches de champignons mises en contact avec des saponines..... 168

3. Utilisation de saponines pour lutter contre des nématodes pathogènes de la vigne et impact environnemental de ce traitement..... 172

Publication n°2 : *Gypsophila paniculata* root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration. 174

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....178

1. Identification de triterpénoïdes synthétisés par la vigne et voies de biosynthèse..... 180

1.1 Bilan des analyses réalisées 180

1.2 Perspectives et poursuite de l'étude : identification des produits formés par les TPS candidates chez la vigne 184

2. Intérêt de la production de triterpénoïdes pour la défense des plantes et pour les consommateurs ... 188

2.1 Intérêt des triterpénoïdes dans la défense des plantes 188

2.2 Intérêt des triterpénoïdes pour les consommateurs de raisin, de vin ou de feuilles de vigne 190

3. Utilisation d'un traitement à base de saponines pour lutter contre des agents pathogènes de la vigne : bilan et perspectives 192

3.1 Traitement à base de saponines pour lutter contre des agents pathogènes fongiques de la vigne : perspectives..... 192

3.2 Perspectives de l'utilisation des saponines pour lutter contre les nématodes vecteurs du GFLV : les mises au point à réaliser 196

3.3 Compréhension du mode d'action des plantes couvre-sol à effet nématicide 198

4. Bilan : les avancées engagées par ce travail de thèse 198

MATERIEL ET METHODES202

1. Le matériel vivant 204

1.1 Matériel végétal utilisé 204

1.1.1	Vitroplants de vigne et sevrage.....	204
1.1.2	Récolte d'organes de différents cépages au vignoble.....	204
1.2	Les agents pathogènes cryptogamiques étudiés.....	205
1.2.1	Mise en culture des champignons étudiés, préparation de milieux	206
1.2.2	Les souches fongiques utilisées.....	206
1.3	Infections de la vigne par des champignons et un oomycète	208
1.3.1	Infection de disques foliaires par <i>Plasmopara viticola</i>	208
1.3.2	Infection de disques foliaires par <i>Erysiphe necator</i>	208
1.3.3	Infection de vitroplants et de disques foliaires par <i>Botrytis cinerea</i>	208
1.4	Test d'efficacité des saponines sur la croissance de champignons	210
1.5	Test d'efficacité des saponines sur la mortalité des nématodes et sur des indicateurs de l'environnement	210
2.	Identification de triterpénoïdes chez la vigne	211
2.1	Identification de saponines dans l'écorce de vigne	212
2.1.1	Extraction à partir de l'écorce	212
2.1.2	Chromatographies sur couche mince.....	212
2.1.3	Fractionnement de l'extrait d'écorce de vigne	212
2.1.4	Identification des composés extraits	214
2.2	Identification de triterpénoïdes à la surface des baies et feuilles de vigne	214
2.2.1	Extraction des triterpénoïdes de la cire des baies	214
2.2.2	Séparation des différentes fractions de produits.....	216
2.2.3	Identification des produits triterpéniques extraits	218
3.	Biologie moléculaire, identification de gènes et analyse de leur expression	219
3.1	Extractions d'ADN.....	220
3.1.1	Extractions d'ADN de champignon Ascomycète	220
3.1.2	Extractions d'ADN de feuilles de vigne.....	220
3.2	Extractions d'ARN	221
3.2.1	Extraction d'ARN de feuilles de vigne	222
3.2.2	Extraction d'ARN des baies	222
3.2.3	Extraction d'ARN du mycélium de champignon Ascomycète	222
3.3	Dosage des acides nucléiques	224
3.4	Traitement DNase des ARN extraits.....	224
3.5	Transcription inverse	224
3.6	PCR, iPCR, Race PCR.....	224
3.6.1	Polymerase Chain Reaction (PCR)	224
3.6.2	PCR inverse (iPCR)	226
3.6.3	Race PCR.....	228
3.7	PCR quantitative en temps réel (qPCR)	228
3.8	TA-cloning [®] , transformations et minipréparations	230
3.9	Séparation de fragments d'ADN sur gel d'agarose.....	232
3.10	Séquençage et analyse des séquences	232
4.	Analyse statistique des résultats.....	234
	VALORISATION DES TRAVAUX.....	236
	BIBLIOGRAPHIE	240
	ANNEXES	261

Introduction bibliographique

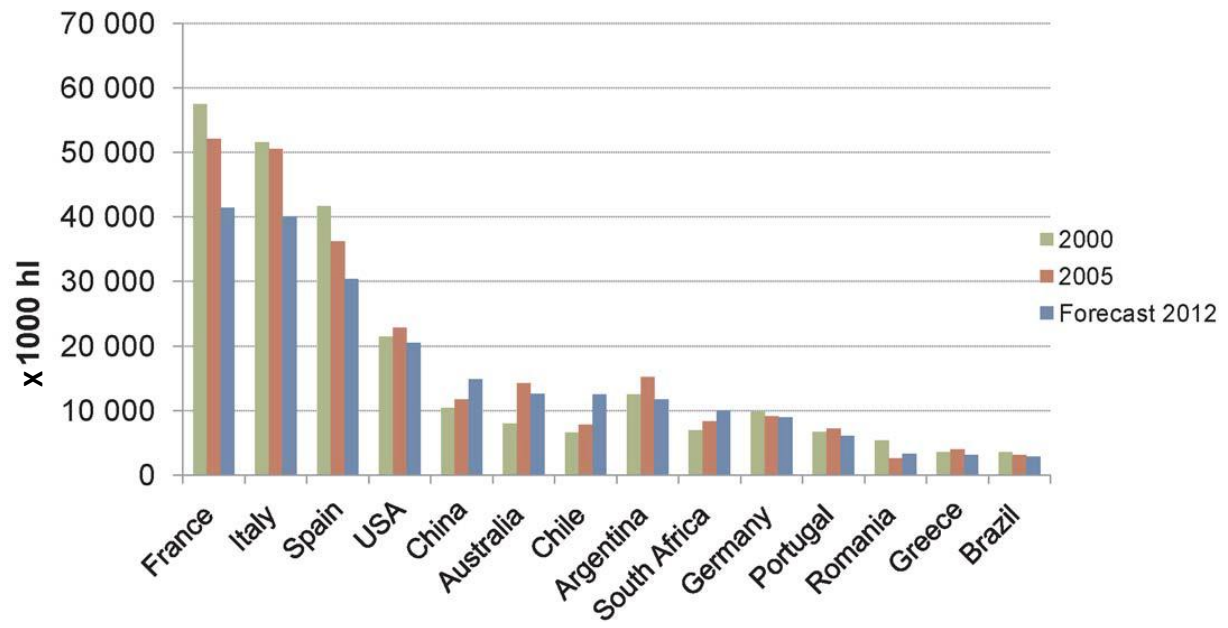


Figure 1 : Volume de production de vin dans les principaux pays producteurs à l'échelle mondiale (OIV, 2013)

Introduction générale

La vigne est une plante ligneuse et pérenne appartenant à la famille des Vitacées. Cette famille comprend 19 genres, dont le genre *Vitis*. Ce dernier comprend lui-même deux sous-genres : *Vitis* (2n=38) et *Muscadinia* (2n=40). La plupart des espèces cultivées appartiennent au sous-genre *Vitis* et sont classées en trois groupes en fonction de leur origine géographique : américaines, asiatiques et européennes. C'est une espèce cultivée depuis plusieurs millénaires, les premières traces de cette culture remontent à plus de 7000 ans (Rowley et Ribaut 2003).

Le cycle végétatif de la vigne se déroule sur un an (Baggiolini 1952). En Europe, de novembre à mars, la vigne est en dormance. Après cette période, l'apparition de pleurs, écoulements de sève brute à la surface des plaies de taille, indique la reprise de l'activité de la plante. Entre mars et avril, le débourrement des bourgeons formés l'année précédente marque le début de la croissance des rameaux. La floraison a lieu aux alentours de juin et est rapidement suivie par la nouaison, transformation des ovaires de la fleur en fruit. Les baies grossissent et au mois d'août survient la véraison caractérisée par un changement de couleur des fruits. La phase de maturation démarre alors et se poursuit jusqu'à la récolte. Lors de la véraison, les rameaux herbacés se lignifient, ceci correspond à l'aoûtement. Les réserves de la plante s'accumulent alors dans le bois et permettent la reprise du cycle végétatif l'année suivante.

Cette culture permet l'obtention de raisin pouvant être consommé en tant que fruit (raisin de table), mais qui peut également être transformé en produits à forte valeur ajoutée tels que le vin, certains produits cosmétiques, l'huile de pépin de raisin et le vinaigre. La France est le principal pays producteur de vin, avec environ 41 millions d'hectolitres produits en 2012 (**Figure 1**). Cette production diminue depuis les années 2000 dans les principaux pays producteurs en Europe du fait de la réduction de la superficie de vignoble en Europe encouragée par l'Union Européenne et des modifications des habitudes de consommation privilégiant un achat de vins moins fréquent mais de qualité (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 36ème Congrès mondial de la vigne et du vin, 2013).

En France, la vigne est cultivée dans des régions aux conditions climatiques très différentes : climat semi-continental (Alsace, Champagne, Bourgogne), océanique (Bordelais, Vallée de la Loire) ou méditerranéen (Vallée du Rhône, Midi, Provence et Corse). Les vignes cultivées en France sont composées de 50 cépages principaux. Les 10 principales variétés de cuve représentent 70% de la

production viticole française : Merlot, Grenache, Ugni blanc, Carignan, Syrah, Cabernet sauvignon, Chardonnay, Cabernet franc, Gamay, Pinot noir (France Agrimer 2010).

La vigne est, comme beaucoup d'espèces cultivées, sensible aux attaques d'agents pathogènes divers. Ces bioagresseurs peuvent être des champignons, des bactéries, des phytoplasmes, des virus, des insectes, des acariens, des nématodes et des vertébrés. Dans une première partie de l'introduction bibliographique, seront présentées les maladies majeures de la vigne, à fort impact économique. Un accent sera mis sur les maladies du bois de la vigne et la maladie du court-noué, maladies que j'ai étudiées dans le cadre de ma thèse et contre lesquelles aucun moyen de lutte efficace et économiquement viable n'est actuellement disponible pour les viticulteurs.

La vigne est en général capable de se défendre contre un certain nombre de bioagresseurs. La deuxième partie de l'introduction bibliographique présentera les moyens de reconnaissance des agents pathogènes par les végétaux et la cascade de signalisation qui en découle afin que la plante puisse mettre en place un système de défense adapté. Une description plus approfondie des voies de biosynthèse et de l'intérêt de la production de saponines, composés préformés dans les plantes et à spectre d'action contre une large gamme d'agents pathogènes, sera réalisée.

Enfin, les moyens mis en place par les plantes pour se défendre face aux attaques de certains bioagresseurs ne sont pas suffisants, et l'apparition de symptômes peut entraîner des pertes de récoltes dommageables pour les agriculteurs et les consommateurs. Différents moyens de lutte ont donc été développés pour permettre de limiter les dégâts causés par ces agents pathogènes. Depuis plus de cinquante ans, les problèmes phytosanitaires qui affectent la vigne ont été gérés essentiellement par des procédés chimiques de synthèse avec des stratégies d'assurance visant à éviter tout risque de maladies. Ceci explique qu'actuellement, bien que la viticulture représente uniquement 3% de la surface agricole utile (SAU) en France, 20% des produits phytosanitaires, dont 80% des fongicides sont utilisés sur la vigne (Aubertot et al. 2005). Cette lourde utilisation de produits chimiques génère des résidus polluent les eaux de surface et souterraines et mettre en danger la santé humaine, la flore et la faune. Dans la troisième partie de l'introduction, le bilan de l'utilisation de produits phytosanitaires sera établi, et différentes méthodes de lutttes plus respectueuses de l'environnement seront ensuite présentées.

1. La vigne, une espèce soumise à de nombreuses pressions parasitaires

1.1 Principales maladies cryptogamiques de la vigne

1.1.1 Anthracnose

L'anthracnose est une maladie d'origine européenne et apparaissant dans les zones plutôt humides. Le champignon Ascomycète *Elsinoe ampelina*, agent causal de la maladie est conservé durant l'hiver sous forme de sclérotas déposés sur les sarments. Au printemps, ils produisent des conidies qui se disséminent sous l'effet des intempéries et se déposent sur les organes verts de la vigne. Après germination, le mycélium envahit les tissus. Sur les sarments et les baies, les symptômes caractéristiques se présentent sous la forme de lésions à zone centrale blanchâtre auréolées de noir. Pour lutter contre l'anthracnose, les traitements anti-mildiou appliqués au vignoble suffisent généralement à limiter le développement de la maladie (Blouin 2007).

1.1.2 Excoriose

L'excoriose est provoquée par l'Ascomycète *Phomopsis viticola*, qui se développe particulièrement lors des pluies. La forme de conservation de ce bioagresseur est la pycnide qui lui permet de passer l'hiver dans le bois nécrosé et les bourgeons. Lors du débourrement de la vigne, les spores sont libérées et disséminées par la pluie. Après une période d'incubation d'une à trois semaines, le mycélium se développe à la surface des organes contaminés. Sur les sarments, les nécroses générées sont peu visibles mais la colonisation des bourgeons est dommageable puisqu'elle empêche les bourgeons de débourrer au printemps suivant. L'infection des grappes par *Ph. viticola* est également lourde de conséquences puisqu'elle entraîne une mauvaise nouaison et un dessèchement. La lutte contre cet agent pathogène peut se limiter à la taille des parties infectées, mais dans les cas plus importants, un traitement antifongique inhibant la germination des spores est nécessaire (Blouin 2007).

1.1.3 Black rot

Le black rot est causé par l'Ascomycète *Guignardia bidwelli*. Pendant la phase hivernale, ce parasite est conservé sous forme de périthèces dans les organes contaminés tombés au sol. Ces périthèces

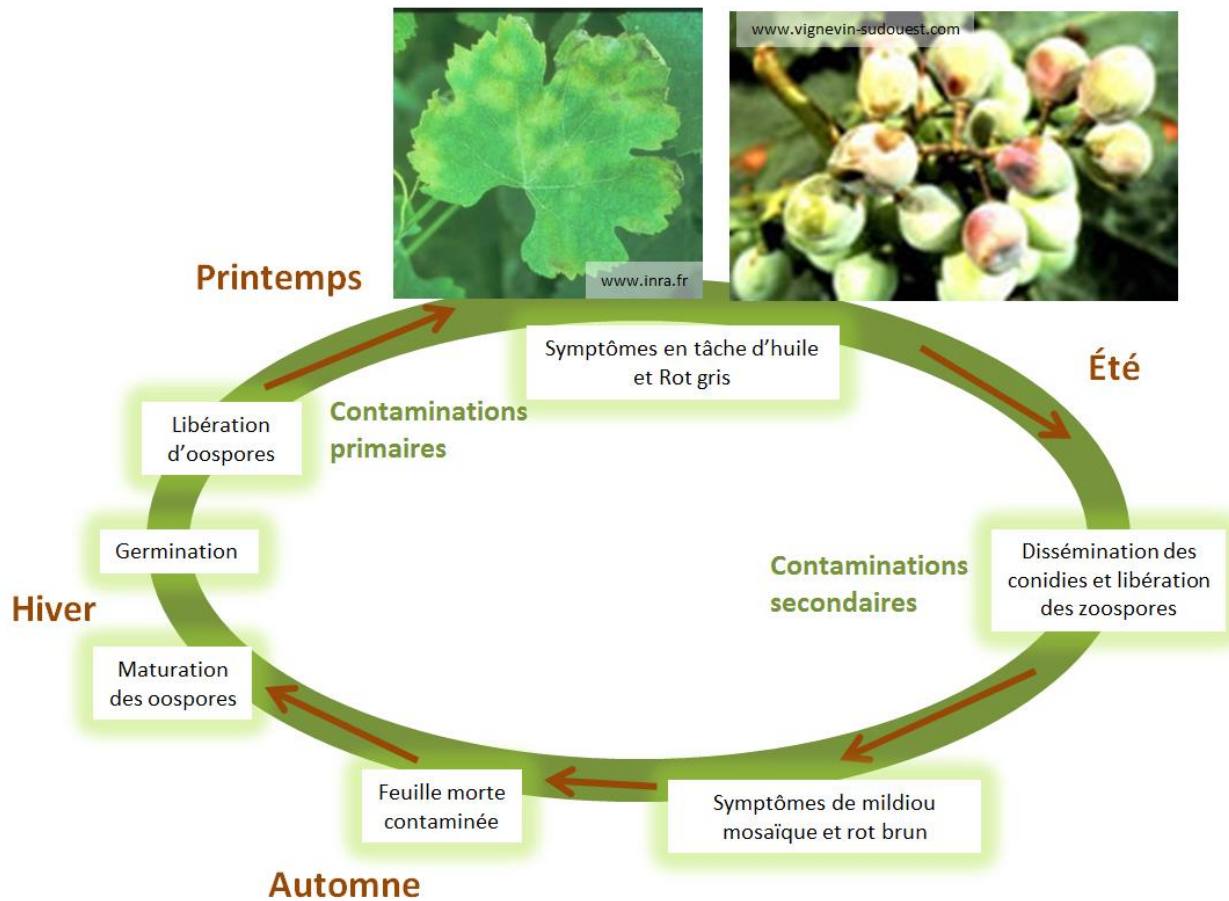


Figure 2 : Cycle de développement de *Plasmopara viticola* sur la vigne (d'après <http://www.agro.basf.fr>)

dérivent des pycnides d'été. Ils renferment 40 à 120 asques qui contiennent elles-mêmes des ascospores. Lors des pluies, les ascospores sont libérées et germent pour donner un tube mycélien se développant sous la cuticule. Deux semaines après l'infection, le mycélium atteint le centre de la feuille et provoque la mort de toutes les cellules. Certains des filaments mycéliens se multiplient pour former des amas, les pycnides. Celles-ci produisent des pycniospores permettant l'infection secondaire des plants (Dubos 2002; Galet 1999). Cet Ascomycète s'attaque préférentiellement aux jeunes organes. Les feuilles contaminées possèdent des taches caractéristiques brun-rouges délimitées par un liseré brun également appelées « taches en coup de fusil ». Trois à quatre jours suivant l'apparition de ces taches, des pycnides noires apparaissent. Elles sont disposées de façon concentrique ou bien sont alignées le long des nervures. Les pycnides sont responsables de la contamination des grappes après la floraison jusqu'au stade de la fermeture de la grappe. Les baies atteintes prennent une couleur fauve et dessèchent en quelques jours. Les traitements antifongiques de contact à appliquer avant les pluies contaminantes permettent une action préventive, tandis que les fongicides systémiques permettent une plus grande souplesse d'application et une action curative (Blouin 2007).

1.1.4 Mildiou

Le mildiou est une maladie causée par l'agent pathogène *Plasmopara viticola*, Oomycète dont l'origine a été localisée en Amérique du Nord. Son introduction accidentelle en 1878 en Europe a causé une crise sanitaire importante dans l'industrie viticole. Cette introduction a été vraisemblablement due à l'importation de boutures de vignes américaines afin de lutter contre le phylloxera (Revue de Gessler et al. 2011). *P. viticola* est conservé durant l'hiver sous forme d'oospores diploïdes abritées dans les feuilles contaminées tombées au sol (**Figure 2**). L'humidité de la saison hivernale est déterminante dans la capacité des oospores à germer au printemps. Ces germinations mènent à la formation de sporanges capables de libérer les zoospores, conidies diploïdes mobiles grâce à leurs deux flagelles. Cette mobilité ainsi que la dispersion grâce aux éclaboussures permettent aux zoospores de contaminer les plants voisins en pénétrant par les stomates de la face inférieure des feuilles. Ces conidies perdent alors leurs flagelles, forment une membrane et émettent un filament mycélien qui se développe dans la chambre sous-stomatique. Ce dernier se développe ensuite entre les cellules végétales et crée une interface d'échange dans laquelle il prélève des nutriments. Après cette phase de contamination, *P. viticola* subit une phase d'incubation (**Figure 2**). Il colonise la feuille sans provoquer de symptôme. L'apparition des taches d'huile survient 8 à 12 jours après l'entrée des zoospores dans la feuille. Des sporangiophores sortent

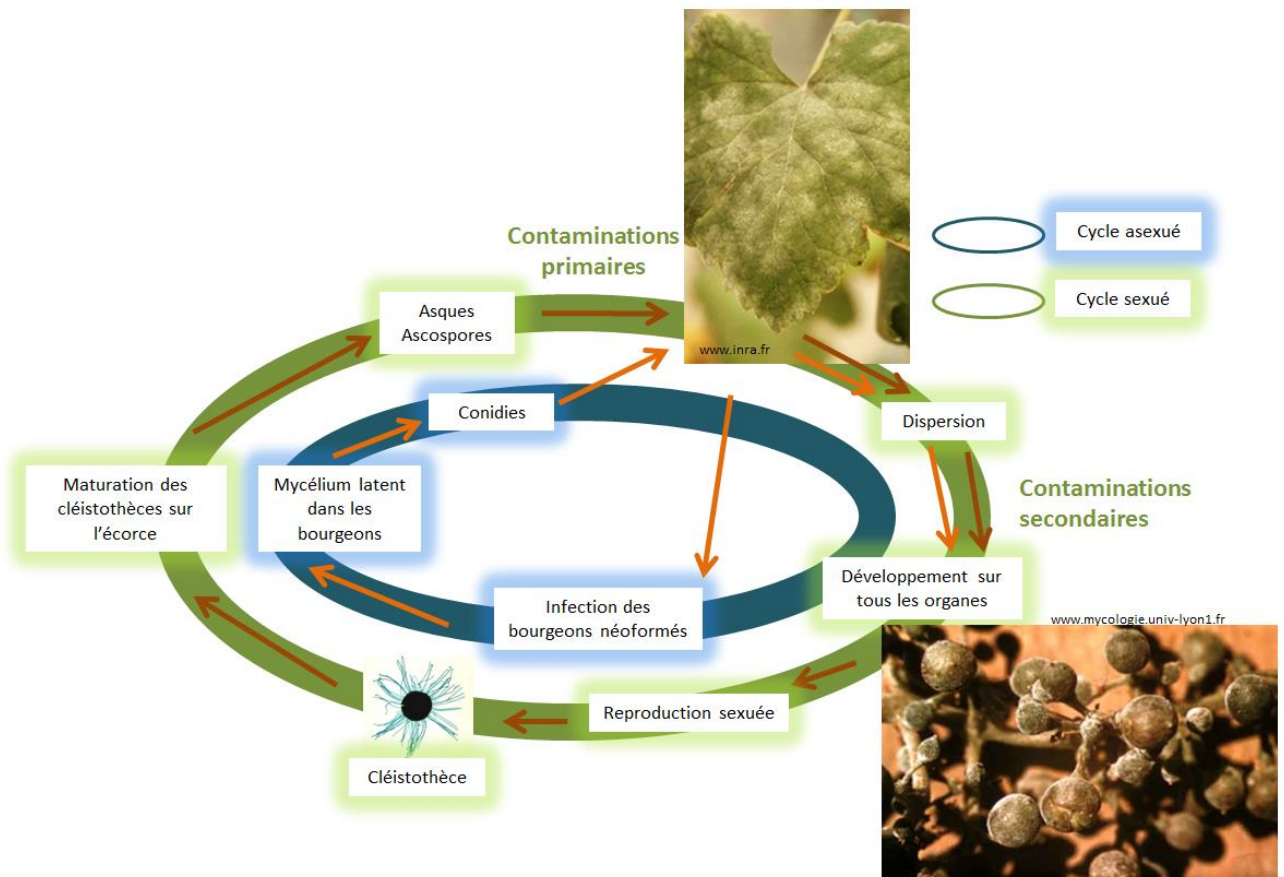


Figure 3 : Cycle de développement de *Erysiphe necator* sur la vigne (d'après G. Raynal)

alors par les stomates sur la face inférieure des feuilles et produisent des zoospores responsables de la contamination secondaire (Dubos 2002; Galet 1999). Ce biotrophe obligatoire affecte l'ensemble des organes herbacés ainsi que les inflorescences et les jeunes baies. Sur la face supérieure des feuilles, les symptômes en forme de tache d'huile jaunâtre sont caractéristiques de la maladie (**Figure 2**). Sous ces taches, sur la face inférieure des feuilles, il est possible de distinguer un duvet blanchâtre correspondant aux sporangiophores au moment de la sporulation. La contamination des feuilles par l'agent pathogène peut entraîner une diminution de l'activité photosynthétique de 85% (Brem et al. 1986). Les inflorescences atteintes présentent des taches brunes et les plus atteintes se dessèchent. Le mildiou provoque l'apparition de taches noirâtres sur les jeunes baies (**Figure 2**), cependant les baies post véraison ne sont plus atteintes (Galet 1999).

Les pertes significatives de production liées à la présence de cette maladie entraînent la nécessité de traiter les parcelles pour limiter les pertes. Le seul moyen de protection actuellement efficace est la lutte chimique. L'utilisation de fongicides de contact réalisée de manière préventive doit être réfléchie selon les conditions climatiques. Les traitements systémiques permettant de s'affranchir du lessivage et à action éradicante doivent néanmoins être raisonnés pour limiter l'apparition de souches résistantes (Blouin 2007). Plus de 430 spécialités (agriculture biologique et conventionnelle) existent actuellement pour traiter les plants infectés par le mildiou (e-phy 2013).

1.1.5 Oïdium

L'agent pathogène responsable de l'oïdium est *Erysiphe necator*, Ascomycète de la famille des Erysiphacées. Cette maladie d'origine américaine a été introduite en Europe au milieu du XIX^e siècle. Ce parasite obligatoire se développe uniquement à la surface des organes et se nourrit via la production d'haustoria s'enfonçant dans l'épiderme pour y prélever des nutriments. Il se conserve sous la forme de mycélium asexué dans les bourgeons dormants ou sous forme de cléistothèces (forme sexuée) dans les anfractuosités de l'écorce. La reproduction asexuée est réalisée par l'intermédiaire de conidiophores produisant chacun un chapelet de 2 à 10 conidies (**Figure 3**). Lors de leur germination, les conidies émettent un suçoir, puis un filament mycélien se développant à la surface de l'organe touché. La fusion d'une anthéridie et d'une oogone entraîne la formation de la forme sexuée, le cléistothèce. Il renferme en général 6 asques qui, lorsque le cléistothèce s'ouvre, libèrent les ascospores. En germant, les ascospores entraînent également la formation de mycélium se développant sur les parties herbacées (Galet 1999). La maladie cause des dégâts sévères chez les plants infectés. Les feuilles contaminées présentent une couleur grise et terne, comme si elles étaient poussiéreuses (**Figure 3**) et l'activité photosynthétique nette peut être réduite de 20% (Lakso

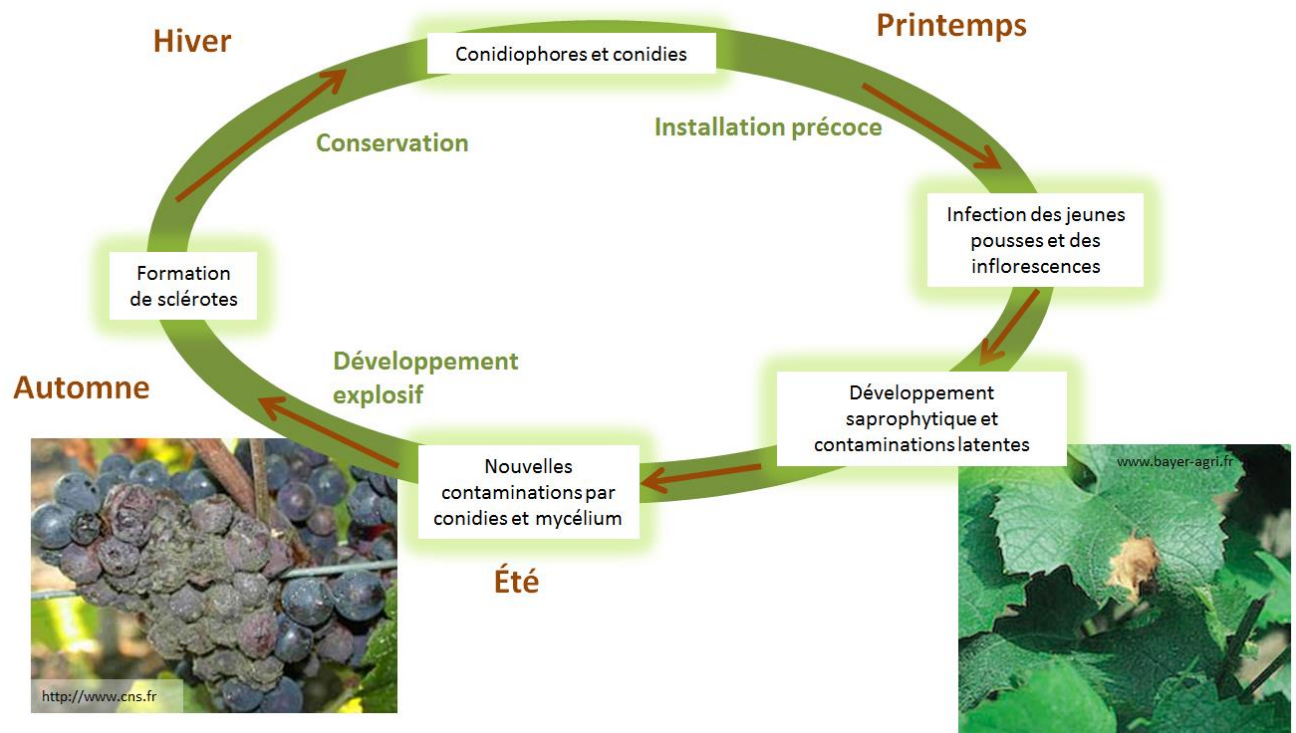


Figure 4 : Cycle de développement de *Botrytis cinerea* (d'après <http://www.agro.basf.fr>)

et al. 1982). Les inflorescences peuvent être attaquées avant la floraison, ce qui provoque leur avortement et leur chute. Les baies sont principalement infectées avant véraison et leur surface présente une fine poussière blanche à grisâtre (**Figure 3**). Les grappes atteintes doivent être éliminées au moment de la récolte car l'infection modifie les propriétés organoleptiques des baies (Darriet et al. 2002; Gadoury et al. 2001). L'oïdium est une maladie qui peut entraîner une perte totale de récolte chez les espèces sensibles. Elle est de ce fait plus dommageable que le mildiou puisqu'elle se manifeste davantage.

De la même manière que pour le mildiou, seule la protection chimique est réellement efficace. Les fongicides systémiques comme les inhibiteurs de biosynthèse des stérols sont efficaces à faible température, cependant il est important de changer de familles de substances afin de limiter l'apparition des résistances (Blouin 2007). Le soufre en poudrage peut également être utilisé. Pas loin de 280 spécialités (agriculture biologique et conventionnelle) sont disponibles pour lutter contre *Erysiphe necator* (e-phy 2013).

1.1.6 Pourriture grise

La pourriture grise est une maladie décrite depuis l'Antiquité, elle est causée par l'Ascomycète *Botrytis cinerea*. Durant l'hiver, le champignon se conserve sous forme d'amas mycéliens appelés sclérotés (**Figure 4**). Ces sclérotés produisent des conidiophores qui libèrent des conidies au printemps. Ces conidies germent et le mycélium se développe alors sur l'organe contaminé (Elad et al. 2004)

La forme la plus répandue de la maladie est la forme conidienne, elle atteint les feuilles et les grappes et peut varier dans sa morphologie et son anatomie. Les jeunes feuilles sont les plus infectées et présentent des taches brunes irrégulières ressemblant à des brûlures sur la face supérieure (**Figure 4**). Un réseau grisâtre se développe sur la face inférieure. Le parasite peut également infecter les inflorescences avant floraison et subsister jusqu'à l'apparition des baies qu'ils contaminent ensuite. Les jeunes baies contaminées flétrissent et se dessèchent. Il existe un cas d'infection par *B. cinerea* appelé pourriture noble. Elle ne survient que lorsque les conditions climatiques sont défavorables à un développement rapide du champignon : un temps sec et froid nécessitant donc des vendanges tardives (Dubos 2002; Galet 1999). La pourriture grise affecte les baies (**Figure 4**), c'est la manifestation la plus dommageable de la maladie, les pertes de rendement peuvent être très élevées et la qualité des récoltes est également affectée puisque la maladie entraîne la dégradation des pigments et de la pellicule contenant les substances aromatiques. Elle

provoque aussi une augmentation de la fixation de SO₂ dans les vins et l'augmentation de l'acidité volatile (Ribereau-Gayon 1982; Blouin 2007).

Les pratiques culturales permettent de limiter l'incidence de la maladie. Utiliser des cépages résistants, favoriser l'aération des grappes, ne pas utiliser de porte-greffe trop vigoureux et ne pas réaliser de plantation trop rapprochée sont autant de méthodes qui permettent de limiter l'utilisation de produits phytopharmaceutiques (Blouin 2007). Soixante quatre spécialités (agriculture biologique et conventionnelle) permettent de traiter les parcelles infectées (e-phy 2013).

1.1.7 Maladies du bois

Les maladies du bois sont considérées comme très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole. Les parasites responsables de ces maladies provoquent à plus ou moins long terme la mort du cep et peuvent nécessiter un renouvellement des plants pouvant atteindre plus de 10% d'un vignoble (Grosman et Doublet 2012; Bruez et al. 2013). Aucun cépage cultivé n'a été jusque-là identifié comme résistant à ces maladies. Le vignoble français regroupe trois principales maladies du bois : l'eutypiose, l'esca et le *Botryosphaeria dieback* ou Black Dead Arm (BDA). Ces maladies de dépérissement sont associées à la présence de différents champignons capables de dégrader les tissus ligneux (Bertsch et al. 2012).

1.1.7.1 Eutypiose

L'eutypiose est causée par un agent pathogène unique, *Eutypa lata*. Cet Ascomycète libère des ascospores qui pénètrent dans les blessures de taille principalement durant la dormance hivernale (Blouin 2007). L'apparition des symptômes peut survenir 5 à 10 ans après infection par *E. lata* et leur expression est aléatoire (Wicks et Creaser 2001).

Les vignes infectées par cette maladie présentent des rameaux chétifs aux entre-nœuds raccourcis. Les feuilles des rameaux atteints sont plus petites, chlorotiques et déformées. La plupart des fleurs sont asséchées et les baies sont de petite taille et désordonnées (Moller et al. 1974). L'étude des feuilles présentes sur les rameaux infectés par *E. lata* montre différentes modifications de leur ultrastructure comme la dégradation de chloroplastes, ce qui génère un déclin de l'activité photosynthétique qui serait en partie responsables de la mort des plants (Philippe et al. 1992). Après infection et colonisation des tissus vasculaires, une bande brune nécrotique se développe. Ce bioagresseur a été classé parmi les agents de la pourriture molle car il se développe à l'intérieur des

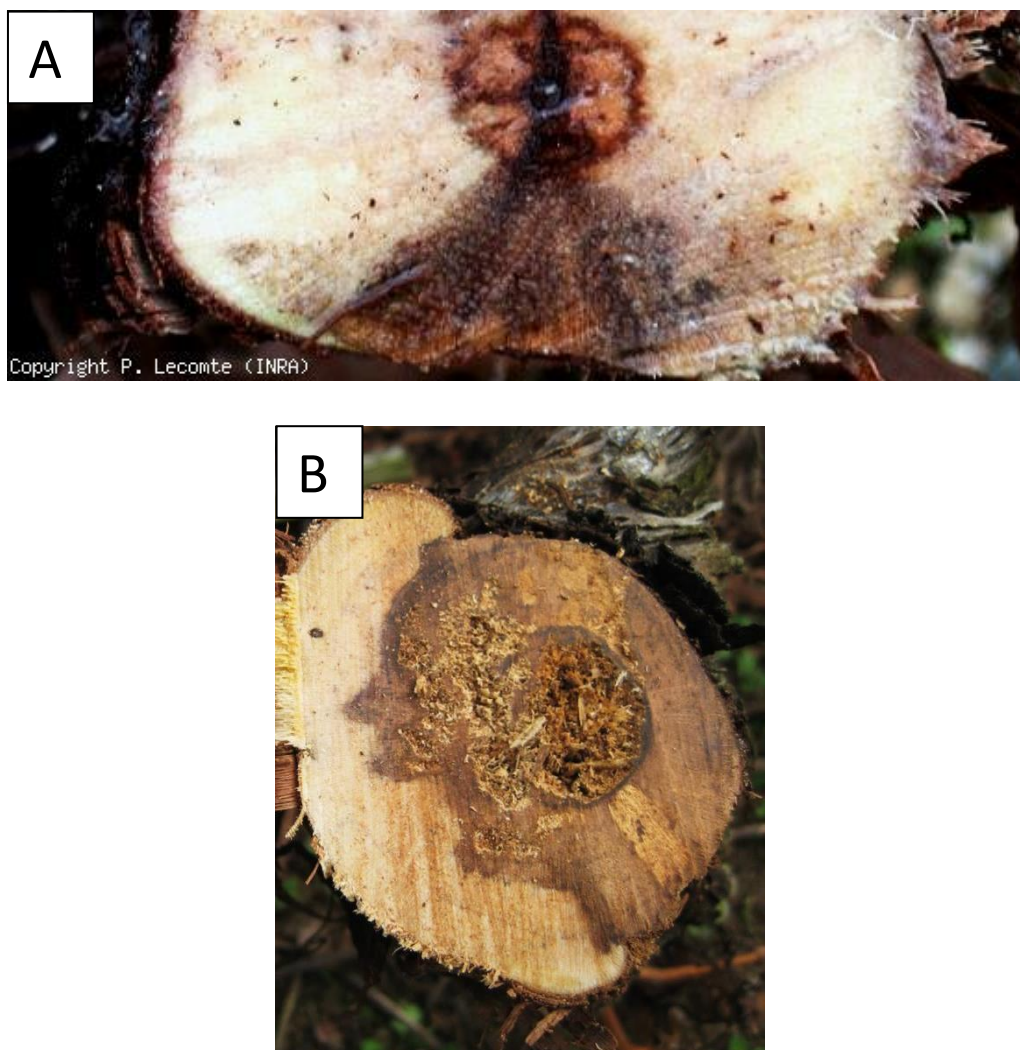


Figure 5 : A : Nécrose sectorielle due à la colonisation d'un cep de vigne par *Eutypa. lata* (P. Lecomte, INRA) et B : nécrose observée sur un cep infecté par l'Esca/BDA (C. Bertsch)

parois secondaires (Larignon 1991). Les coupes transversales des ceps infectés mettent en évidence les nécroses sectorielles causées par *E. lata* (**Figure 5 A**), le bois infecté devient dur et cassant.

E. lata est capable de produire de nombreux métabolites secondaires. L'eutypine, benzaldéhyde sécrété, a été déterminée comme étant la principale phytotoxine produite par ce champignon (Tey-Rulh et al. 1991). Mais la toxicité de ce bioagresseur est certainement la résultante de l'action d'un ensemble de métabolites possédant des niveaux de toxicité divers et des cibles variées dans les cellules végétales (Molyneux et al. 2002).

1.1.7.2 Esca

Les principaux agents de l'esca sont des champignons colonisant les faisceaux vasculaires de la plante parmi lesquels on retrouve principalement *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous et Gams 2000), *Phaeocremonium aleophilum*, *Fomitiporia mediterranea* ainsi que *Stereum hirsutum* (Larignon et Dubos 1997). *P. chlamydospora* est un Ascomycète présent dans la majorité des vignobles. Sa forme sexuée n'est pas connue, il se dissémine de façon aérienne et pénètre dans les plaies de taille pendant les périodes hivernales douces et pluvieuses, il est conservé sous forme de pycnides (Larignon et Dubos 2000). Le champignon peut également se propager par le bois des porte-greffes ou des greffons en pépinière. Deux hypothèses expliqueraient ce phénomène : le mycélium présent dans la souche progresserait dans les rameaux, ou les spores seraient transportées jusqu'aux rameaux par la sève (Larignon et al. 2009). *P. aleophilum* est un Ascomycète également présent dans la majorité des vignobles. Ce champignon a été classé parmi les agents de la pourriture molle de par sa capacité à se développer dans les parois secondaires (Larignon 1991). Il a une dissémination aérienne et est capable de coloniser les plaies de taille hivernales, mais également les plaies réalisées lors des opérations en vert (Larignon et Dubos 2000). Propagé également via les porte-greffes et greffons en pépinière, ce champignon produit des conidies qui ont été retrouvées dans les vaisseaux cribrovasculaires (Feliciano et Gubler 2001). *F. mediterranea*, quant à lui, est un Basidiomycète classé parmi les champignons de la pourriture blanche puisqu'il est capable de dégrader totalement les parois cellulaires (Larignon 1991). Il se conserve sous forme de basidiomes sur les parties infectées et se dissémine via ses basidiospores (Larignon et al. 2009).

Les maladies du bois sont présentes sous deux formes ; une forme lente et une forme foudroyante. La forme lente s'exprime par des décolorations foliaires (**Figure 6**) caractérisées par des digitations jaunes chez les cépages blancs et rouges bordées de jaune chez les cépages noirs (Larignon et al. 2009). La forme foudroyante mène au dessèchement total de un ou plusieurs rameaux (**Figure 7**), les feuilles tombent et les fruits flétrissent et se dessèchent (Mugnai, et al. 1999). Cet événement



Figure 6 : Symptômes foliaires de la forme lente de l'Esca-BDA, digitations jaunes sur cépage blanc

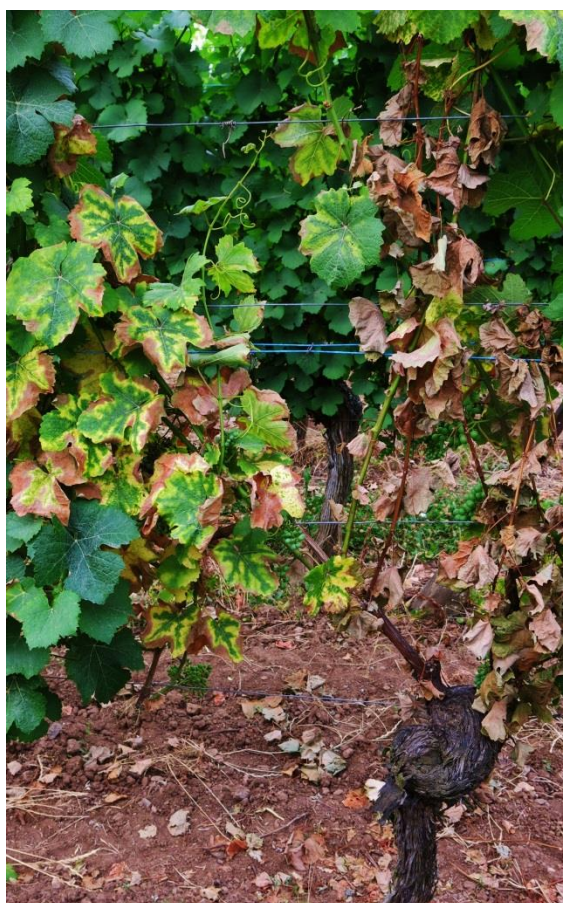


Figure 7 : Rameaux entièrement desséchés, forme apoplectique de l'Esca-BDA, et symptômes foliaires associés à la forme lente de la maladie

violent, rapide et menant à la mort de la plante survient généralement au milieu de l'été, particulièrement lorsque des épisodes secs et très chauds suivent des épisodes pluvieux (Surico et al. 2006). Dans les deux cas, les symptômes sont associés à des nécroses au niveau du bois (**Figure 5 B**). Une zone centrale brune et dure est généralement caractéristique de l'esca, elle évolue en zone claire et molle appelée amadou. Il peut aussi y avoir présence de ponctuations noires.

1.1.7.3 Black Dead Arm

Vingt et une espèces de Botryosphaeriaceae ont été associées au BDA, les principales sont *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* et *Neofusicoccum parvum* (Urbez-Torres 2011; Kuntzmann et al. 2010). Ces Ascomycètes sont présents dans la majorité des vignobles et sont retrouvés dans un grand nombre de plantes chez lesquelles ils produisent des dépérissements (Slippers et Wingfield 2007). Ils sont conservés sur le cep sous forme de pycnides et se disséminent pendant la période végétative de la vigne (Larignon et Dubos 2001) ou par contamination des porte-greffes ou des greffons dans les pépinières.

Les symptômes causés par le BDA sont très similaires à ceux causés par l'esca (**Figures 6 et 7**), cependant, des différences peuvent être observées au niveau des feuilles. La marge des feuilles des vignes infectées par le BDA présente des taches orangées pour les cépages blanc et bordeaux pour les cépages rouges. Chez ces mêmes cépages, il y a absence de bande jaune. Ces symptômes foliaires apparaissent relativement tôt, courant mai-juin, par rapport aux symptômes foliaires de l'esca qui apparaissent en juin-juillet. Au niveau du bois, les bandes brunes sont des symptômes caractéristiques du BDA (Urbez-Torres 2011).

1.1.7.4 Pistes de compréhension de ces maladies complexes

Les maladies du bois de la vigne sont des maladies complexes qui mettent certainement en jeu de nombreux paramètres et dont la compréhension des mécanismes est encore en cours. En effet, les champignons associés aux maladies du bois sont exclusivement retrouvés dans le bois et jamais dans les feuilles symptomatiques. De plus, le postulat de Koch visant à identifier le ou les agents pathogènes responsables d'une maladie est difficile à vérifier. Aussi, de nombreuses hypothèses sont émises quant à l'origine des symptômes de ces maladies. Pour certains, la maladie pourrait se développer du fait de l'action de complexes bactériens qui affaibliraient la plante et entraîneraient l'installation de ces champignons opportunistes (Bruez 2013). Pour d'autres, des composés seraient excrétés par les champignons, transloqués dans les feuilles par la sève brute et causeraient l'apparition des symptômes foliaires (Mugnai et al. 1999 et travaux du Laboratoire Vigne

Biotechnologies et Environnement). En effet, certaines toxines produites par des champignons impliqués dans les maladies du bois ont été identifiées. *P. Aleophilum* et *P. chlamydospora* produisent des naphthalenone pentaketides et des polyphénols et outre ces toxines, les Botryosphaeriacees produisent de la melléine (Andolfi et al. 2011).

1.1.7.5 Moyens de lutte disponibles contre les maladies du bois

Avant 2001, l'unique fongicide efficace pour limiter la progression des maladies du bois était l'arsénite de sodium. Ce produit a été supprimé dans tous les pays viticoles à partir de 2001 du fait de sa toxicité non seulement pour l'environnement mais aussi pour l'homme, mais aucune méthode de lutte de remplacement satisfaisante n'a été proposée pour l'instant aux viticulteurs (Bertsch et al. 2009). De plus, il semblerait que, plus qu'éradiquer la maladie, l'arsénite de sodium limitait l'expression des symptômes foliaires (Fussler et al. 2008).

Dans le cas des nouvelles plantations, les mesures prophylactiques sont l'apport de végétaux sains au vignoble. Il est conseillé d'éviter les situations de stress aux vignes nouvellement plantées. Dans les plantations établies, il faut réaliser les tailles tardivement et éliminer les bois morts. Il serait également important de limiter les apports nutritifs afin de contrôler la vigueur des plants (Blouin 2007) et de réaliser la taille Guyot-Poussard recommandée par le service interprofessionnel de conseil agronomique vinification et analyses du Centre et permettant un trajet optimal de la sève.

De nombreuses recherches ont été engagées pour trouver une solution à cette absence de traitement. En pépinière, il a été montré qu'un traitement à l'eau chaude (50°C pendant 30 mn) du matériel de propagation permet de réduire l'incidence de *P. chlamydospora* (Edwards et al. 2004). L'application de certains fongicides sur les plaies de taille permettait de réduire le développement des maladies, mais les produits tels que l'Atemicép (Sandoz Agro) et l'Escudo (Dupont solutions) ont été progressivement retirés du marché (Bertsch et al. 2012). Les politiques de réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires n'encouragent pas à poursuivre la recherche de solutions issues de l'industrie chimique. Les recherches sur les microorganismes utilisés en lutte biologique et notamment sur l'Oomycète *Pythium oligandrum* ont permis de montrer que sa présence dans la vigne permet d'augmenter la résistance à différents agents pathogènes dont *P. chlamydospora* associé à l'esca (Gerbore et al. 2011). Une piste de recherche sur le chitosan, molécule non toxique, biodégradable à activité fongistatique et connue pour sa capacité à éliciter des défenses chez les plantes a permis de montrer que cette molécule est capable de réduire le développement de *E. lata*, *P. chlamydospora* et *Fomitiporia* spp. *in vitro* ainsi que de limiter l'incidence de la maladie causée par *P. chlamydospora* en serre (Nascimento et al. 2007).

1.2 Maladies à phytoplasme et leurs vecteurs

1.2.1 Maladie du bois noir

La maladie du bois noir est causée par un phytoplasme, parasite des vaisseaux du phloème. Les phytoplasmes sont différenciés des bactéries par leur absence de paroi. Ce sont des parasites stricts vivant dans les cellules vivantes de plantes ou d'insectes vecteurs et qui détournent leur activité métabolique (Weintraub et Beanland 2006). L'insecte hémiptère *Hyalosthetes obsoletus* est le principal vecteur du bois noir en Europe (Sforza et al. 1998). L'épidémiologie du bois noir est complexe en raison de la large gamme de plantes hôtes du phytoplasme et de son vecteur. Les phytoplasmes du stolbur, groupe auquel appartient l'agent responsable du bois noir, peuvent infecter environ quatre-vingt espèces de plantes et *H. obsoletus* est une espèce polyphage privilégiant les plantes adventices des vignobles à la vigne, qui est en fait une nourriture erronée pour cet insecte (Sforza et al. 1998).

Les symptômes peuvent être observés sur différents organes. Les feuilles s'enroulent vers le bas et des taches apparaissent. Les sarments sont caractéristiques par le retard ou le manque d'aoûtement, ils restent minces, caoutchouteux et pendants. Les fruits flétrissent puis les grappes dessèchent. Lorsque la maladie survient précocement, les inflorescences se dessèchent (Blouin 2007).

Etant donné la variété des plantes hôtes de l'insecte vecteur, les traitements insecticides ne sont pas adaptés. La lutte contre *H. obsoletus* se limite donc à l'élimination des plantes hôtes présentes à proximité des parcelles (Blouin 2007).

1.2.2 Flavescence dorée

La flavescence dorée est l'une des jaunisses de la vigne également causée par un phytoplasme. Le phytoplasme qui en est responsable est transmis de cep à cep par la cicadelle *Scaphoideus titanus*, un hémiptère phloémophage provoquant une maladie épidémique à dissémination rapide dans les vignobles (Weintraub et Beanland 2006). Depuis son introduction en Europe dans les années 50, elle étend de plus en plus son territoire de dispersion. Elle est présente dans de nombreux départements en France, en Suisse et en Italie (Galet 1999).

Les symptômes de la flavescence dorée sont bien visibles en été, mais les vignes atteintes précocement peuvent être repérées dès le printemps par leur croissance réduite et parfois par l'absence de sarments. La caractéristique principale de la maladie est qu'elle a fortement tendance à évoluer en foyer. C'est ce qui permet de la différencier du bois noir qui provoque les mêmes

symptômes. Des analyses en laboratoire par PCR (Polymerase chain Reaction) peuvent aussi être effectuées afin de différencier les deux maladies (Schaerer et Johnston 2007).

La flavescence dorée est classée parmi les maladies de quarantaine soumises à la lutte obligatoire (Schaerer et Johnston 2007), les traitements à appliquer sont donc réglementés par arrêté ministériel et préfectoral. Environ 120 spécialités (agriculture biologique et conventionnelle) sont autorisées sur le marché pour lutter contre la cicadelle (e-phy, 2013). La stratégie standard de lutte contre la cicadelle de la flavescence dorée repose sur trois interventions permettant de contrôler les populations de larves et d'adultes ailés (Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et de la pêche 2009).

1.3 Maladies à virus économiquement importantes et leurs vecteurs

1.3.1 Maladie de l'enroulement

Cette maladie virale est causée par un *Closterovirus* appelé *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) classé actuellement en 11 sérotypes, dont trois espèces principales affectent principalement la vigne (Le Maguet 2012). Le greffage est la principale source de contamination, mais des cochenilles vectrices sont également capables de transmettre le virus.

Les symptômes les plus caractéristiques sont visibles sur les feuilles et les grappes. Chez les cépages rouges infectés, les feuilles prennent d'abord une couleur rougeâtre, les nervures restent vertes. Les décolorations sont plus difficilement identifiables chez les cépages blancs. Puis les feuilles s'enroulent vers l'intérieur, prennent un aspect gaufré et s'épaississent. Sur les grappes, les baies se décolorent. Les dégâts causés par cette maladie sont importants puisqu'ils touchent le développement et le nombre de grappes et entraînent des retards de maturation qui génèrent une hausse de l'acidité.

1.3.2 Maladie du court-noué

La maladie du court-noué de la vigne est une maladie à virus qui entraîne une dégénérescence ou un dépérissement de la vigne. Elle est présente dans la majorité des vignobles de par le monde. Elle conduit souvent à une baisse de rendement et de la qualité de la récolte et à un arrachage prématuré de la parcelle (Andret-Link et al. 2004). L'expression des symptômes varie en fonction de l'isolat viral, des conditions pédoclimatiques et du cépage infecté. Elle est caractérisée par différents



Figure 8 : Symptômes du court noué. Sur la photo de gauche, le plant infecté par le court noué présente un jaunissement foliaire et un raccourcissement des entre-nœuds. La photo de droite présente la différence phénotypique entre un plant infecté aux entre nœuds raccourcis et dont la grappe a une taille réduite (à gauche) et un plant sain (à droite)

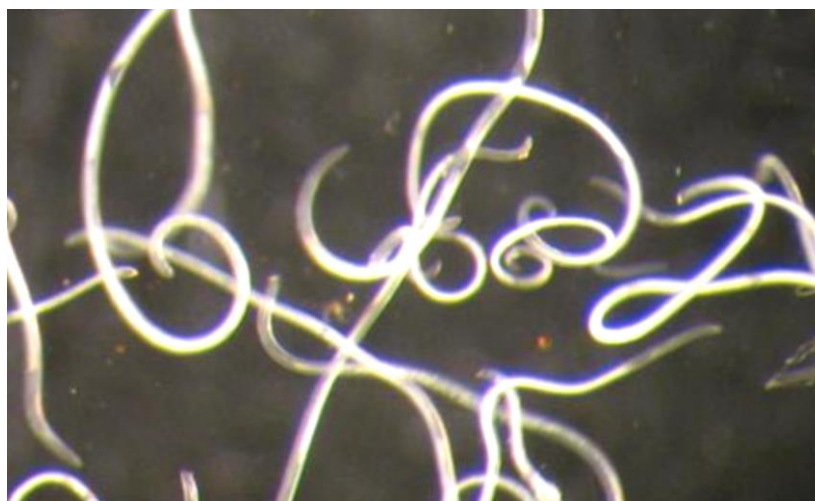


Figure 9 : Morphologie de *Xiphinema index* (Fischer et al. 2011)

symptômes au niveau des organes aériens. Les feuilles des plants infectés présentent des décolorations ou des déformations du limbe (**Figure 8**), la déformation des bords de la feuille lui donnent un aspect en éventail étant à l'origine de son nom (en anglais « fanleaf »). Les sarments subissent généralement un raccourcissement des entre-nœuds (**Figure 8**), d'où le nom de la maladie du court-noué. Les vignes infectées subissent après plusieurs années une diminution de la végétation mais également une diminution du nombre et de la taille des grappes. Le métabolisme général de la plante est également altéré. La maladie conduit donc souvent à une baisse de rendement jusqu'à 80% et de la qualité de la récolte et à un arrachage prématuré de la parcelle (Andret-Link et al. 2004). En France, 60% des parcelles de vigne sont touchées par cette maladie (Demangeat et al. 2005).

1.3.2.1 Virus responsables de la maladie

Seize espèces virales, dont 15 *Nepovirus* induisent la maladie du court-noué chez la vigne (Martelli et Boudon-Padiou 2006). Le virus dénommé *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) est le principal agent responsable de cette maladie. En France, l'*Arabis mosaic virus* (ArMV) est également responsable de cette maladie mais dans une moindre mesure. Ces deux *Nepovirus* sont transmis naturellement et spécifiquement de vigne à vigne par deux espèces différentes de nématodes vecteurs: *Xiphinema index* (**Figure 9**) pour le GFLV et *X. diversicaudatum* pour l'ArMV (Taylor et Brown 1997). Cette transmission a lieu lors de l'alimentation des nématodes au niveau des racines de vignes en croissance. Le GFLV est un népovirus dont les connaissances au niveau structural et génomique sont très avancées. Son génome est constitué de deux molécules d'ARN simple brin, et d'ARN satellite chez certains isolats (Fuchs et al. 1989). La séquence du génome ainsi que celle de l'ARN satellite ont été déterminées (Serghini et al. 1990). L'ARN1 contient 1 gène codant une polyprotéine clivée ensuite en 5 gènes. L'ARN2 est nécessaire au mouvement du virus de cellule à cellule (Le Gall et al. 2008). La protéine de coque virale est la seule protéine structurale du génome. Elle est nécessaire à la transmission spécifique du GFLV par *X. index* (Andret-Link et al. 2004). L'étude d'isolats viraux dont la transmissibilité à *X. index* différait a permis de montrer que la spécificité de transmission serait principalement liée à une région protéique chargée positivement. Cette dernière permettrait l'interaction avec les récepteurs de l'appareil alimentaire des nématodes (Schellenberger et al. 2011).

1.3.2.2 Vecteurs des virus responsables de la maladie du court-noué

Comme décrit précédemment, les nématodes *X. index* et *X. diversicaudatum* sont respectivement vecteurs du GFLV et de l'ArMV. Le nématode *X. index* a été particulièrement étudié, sa gamme d'hôte est très étroite, principalement le figuier, non hôte du virus, et la vigne, hôte du virus. Les œufs sont

pondus isolément dans le sol. Après éclosion, le nématode passe par 4 stades larvaires avant de devenir adulte, chaque stade étant capable d'acquérir et de transmettre le virus (Taylor et Brown 1997). La reproduction de *X. index* est principalement parthénogénétique et les mâles sont très rares, ce mode de production permet à une seule femelle virulifère de générer un foyer de propagation du virus (Villate et al. 2010). L'analyse de la distribution verticale de *X. index* montre qu'il est souvent absent des horizons supérieurs et que les populations les plus importantes sont retrouvées au niveau de la rhizosphère entre 50 et 100 cm de profondeur (Villate 2008), ce qui rend difficile la lutte contre ce vecteur de virus.

1.3.2.3 Moyens de lutte disponibles pour lutter contre la maladie du court-noué

La désinfection des sols permettait de contrôler les populations de nématodes vecteurs du court-noué sans pour autant les éradiquer. Cependant, l'Aldicarbe (granulés) et le Dichloropropène (fumigants), molécules ayant une toxicité aigüe sont aujourd'hui interdits (European Commission 2007). Les seuls moyens disponibles actuellement pour lutter contre la maladie sont d'une part dans les parcelles saines de pratiquer la prophylaxie afin d'éviter toute introduction de virus et d'autre part dans les vignobles infectés de dévitaliser puis arracher les ceps malades pour détruire les racines et priver les nématodes de ressources alimentaires. Afin d'être sûr qu'il ne subsiste plus de nématodes, il est nécessaire de laisser le sol au repos pendant 7 à 10 ans (Demangeat et al. 2005), ce qui est incompatible avec les enjeux économiques de la viticulture.

Des méthodes de lutte alternatives sont en cours de développement ou d'évaluation, elle sont citées ci-après et développées dans le troisième chapitre de l'introduction bibliographique. L'utilisation de plantes couvre-sol antagonistes vis-à-vis de *X. index* permet par exemple de réduire l'effectif des nématodes en comparaison avec un sol nu (Villate et al. 2012). La résistance naturelle de la variété sauvage de vigne *Muscadinia rotundifolia* à *X. index* a été utilisée, son introgression dans des variétés de porte-greffes a permis l'obtention d'un nouveau porte-greffe nommé Némadex Alain Bouquet, retardant la contamination par le GFLV (Bouquet et al. 2003; Esmenjaud et Bouquet 2009). Enfin, le développement de vignes transgéniques résistantes au virus par la stratégie de résistance dérivée du pathogène a été envisagé et permettrait un retard d'apparition de la maladie (Vigne, Komar, et Fuchs 2004; Hemmer et al. 2009; Gambino et al. 2010; Jelly et al. 2012).

Ainsi, aucune stratégie de lutte n'est actuellement totalement efficace et économiquement viable contre la maladie du court-noué. La combinaison des différentes méthodes proposées permettrait d'amoindrir l'incidence de la maladie, mais le développement de nouvelles méthodes plus efficaces doit se poursuivre.

2. Les réponses des plantes face aux agressions parasites

2.1 Coévolution entre les plantes et leurs bioagresseurs

Les plantes se développent dans un environnement complexe dans lequel elles sont soumises à une forte pression parasitaire. Cependant, peu d'interactions plantes microorganismes aboutissent au développement d'une maladie. Une course de coévolution a lieu entre les plantes, qui développent des systèmes sensibles de reconnaissance de la présence des agents pathogènes et mettent en place des réponses de défense adaptées au type d'attaque ; et les agents pathogènes qui génèrent des molécules capables de détourner les réponses de défense des plantes (Pieterse et al. 2009). Différents types de résistances existent dans le cadre d'interactions plantes-agents pathogènes. Dans le cas où l'attaque de microorganismes appartenant à une espèce donnée n'entraîne pas de symptôme de maladie chez une plante ou lorsque ces agents pathogènes ne peuvent pas pénétrer la cuticule ou mettre en place leur cycle infectieux, il s'agit d'une résistance non hôte (Nürnberger et Lipka 2005). Elle est caractérisée par deux formes. La première traduit l'incapacité d'un microorganisme à pénétrer à l'intérieur de la plante, à franchir la cuticule ou la paroi cellulaire, ou encore à se développer et mettre en place son cycle infectieux. La seconde induit une mort cellulaire programmée qui permet de limiter la progression du microorganisme dans la plante (Lipka et al. 2010; Cheng et al. 2012). La compréhension des bases moléculaires des mécanismes de défense des plantes pourrait permettre de développer des pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement. En effet, la stimulation des défenses de la plante permettrait de limiter l'utilisation de produits phytosanitaires.

2.2 Reconnaissance des agents pathogènes

Les plantes produisent des barrières structurales comme la cuticule qui recouvrent leurs différents organes. Ces barrières permettent de limiter les attaques microbiennes mais ne sont pas suffisantes dans de nombreux cas, car certains agents pathogènes sécrètent des enzymes comme les cutinases. Les microorganismes qui parviennent à pénétrer directement dans les cellules sont nommés agents nécrotrophes, et ceux qui développent des systèmes de pénétration des tissus sans dégrader les cellules sont nommés agents biotrophes ; les hémibiotrophes, quant à eux ont un caractère biotrophe en début de cycle infectieux et nécrotrophe en fin de cycle. Dans tous les cas, les plantes ont développé des systèmes de reconnaissance des attaques biotiques.

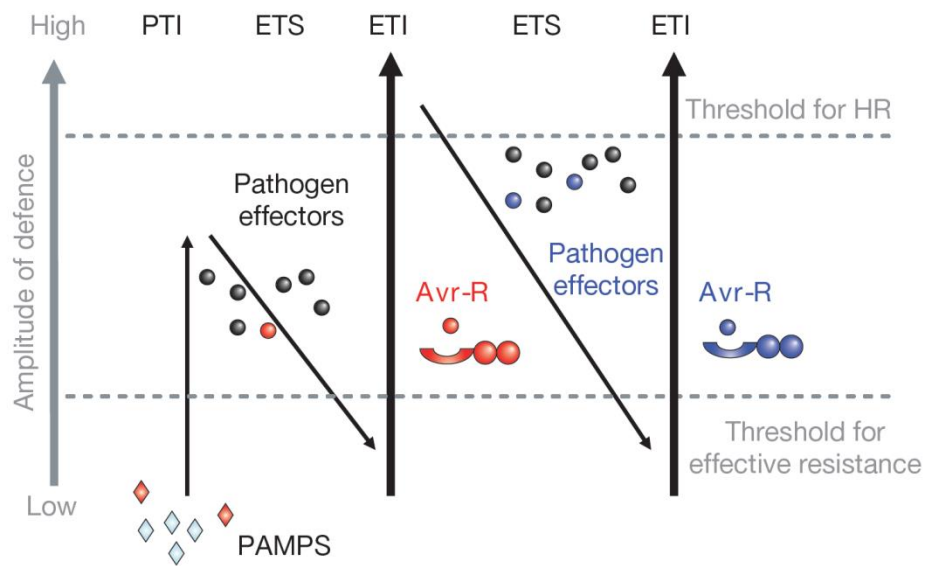


Figure 10 : Modèle en zig-zag : illustration de la course coévolutive entre les plantes et les agents pathogènes (Jones et Dangl 2006)

PTI : Plant triggered immunity; ETS : Effector triggered susceptibility; ETI : Effector triggered immunity

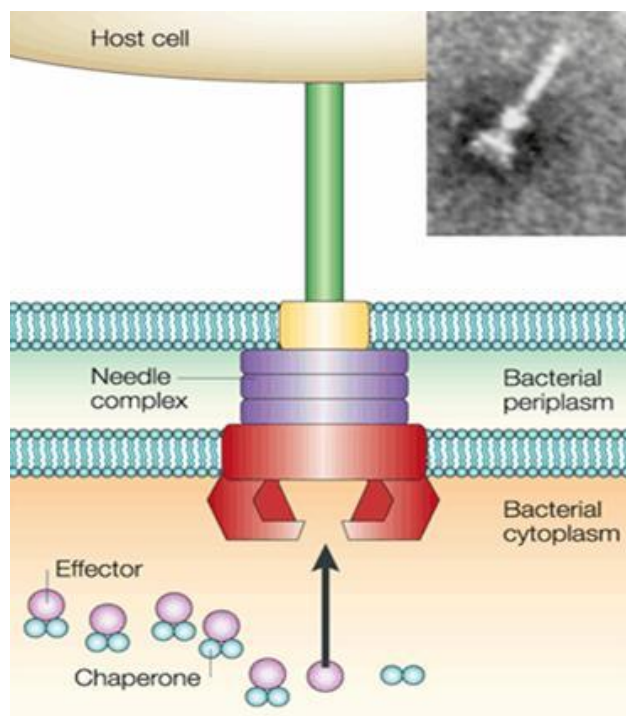


Figure 11 : Le système de sécrétion de type III développé par les bactéries Gram-négatives pour injecter leurs effecteurs directement dans les cellules de la plante hôte. (University of South Alabama).

2.2.1 Résistance non spécifique : PAMP-triggered immunity

Le premier niveau de reconnaissance d'un agent pathogène par une plante est lié à la reconnaissance par des protéines membranaires appelées PRRs (Pattern Recognition Receptors) de motifs moléculaires caractéristiques excrétés ou présents à la surface des agents pathogènes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Mishina et Zeier 2007). Ces motifs microbiens ciblés sont conservés et caractérisés par une évolution lente, c'est le cas des flagellines, chitines, glycoprotéines et lipopolysaccharides (Zipfel et Felix 2005). Cette reconnaissance mène à une PTI (PAMPs-Triggered Immunity), un ensemble de réactions de défense mis en place et permettant d'empêcher de nouvelles attaques par l'agent pathogène (Nicaise et al. 2009).

2.2.2 Résistance spécifique : Effector-triggered immunity

Le premier niveau de défense mis en place par les plantes n'est pas toujours suffisant pour repousser les agents pathogènes. Au cours de la coévolution plantes-bioagresseurs, les plus virulents d'entre eux ont acquis la capacité à libérer des effecteurs interférant avec la PTI et capables d'inhiber les défenses basales et de provoquer des symptômes de maladie (**Figure 10**). Ce phénomène est appelé «Effector-Triggered Susceptibility » (ETS).

Un mécanisme mis en place par les bactéries pour contourner la PTI a été particulièrement étudié, il s'agit du système de sécrétion de type III grâce auquel les molécules effectrices spécifiques sont directement injectées dans le cytoplasme des cellules végétales (**Figure 11**). Contrairement au système de sécrétion d'effecteurs des bactéries, la production d'effecteurs par les champignons a été moins largement étudiée. Il est cependant connu que les agents pathogènes fongiques délivrent leurs effecteurs à l'intérieur des cellules de leur hôte (Birch et al. 2008). Chez *Plasmopara viticola*, parasite biotrophe de la vigne, une banque d'ESTs (Expressed Sequence Tags) codant des protéines présentant des homologies de séquence avec des effecteurs caractérisés (effecteurs candidats) a été identifiée et il a été montré que l'expression de ces gènes augmente lors de l'infection de feuilles de vigne par le mildiou (Mestre et al. 2012).

Pour contrer cette ETS, un niveau supérieur et spécifique de défense a été développé dans la plante via les protéines polymorphes NB-LRR (Nucleotide Binding – Leucine Rich Repeat) codées par les gènes de résistance R. Un effecteur donné est spécifiquement repéré directement ou indirectement par une des protéines NB-LRR. Suite à cette reconnaissance, une cascade de signalisation conduit au déclenchement d'une réaction d'immunité chez la plante. Cette phase correspond à l'ETI (Effector-triggered immunity). De l'ETI résulte une résistance à la maladie et généralement une réaction

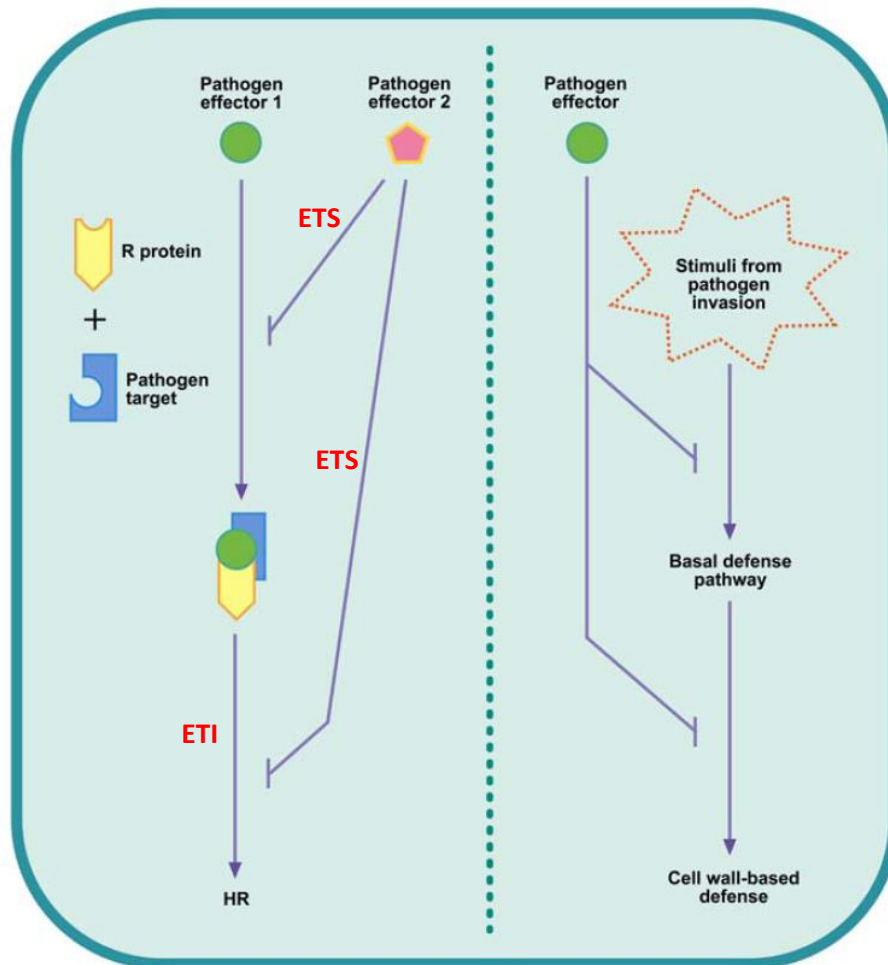


Figure 12 : Contournement de la résistance par l'agent pathogène et réponse de la plante : implication des effecteurs et des protéines R (Ponciano et al. 2003)

ETS: Effector-triggered susceptibility; ETI: Effector-triggered immunity

d'hypersensibilité (HR) au niveau du site d'infection ainsi qu'une activation des réactions de défense. Les effecteurs détectés par les plantes sont produits sous l'influence de gènes d'avirulence (*Avr*), tandis que les effecteurs non reconnus et donc responsables du développement de maladies sont synthétisés du fait de l'activation de gènes de virulence (Ponciano et al. 2003; Jones et Dangl 2006). Contrairement aux défenses basales, l'interaction entre une plante exprimant une protéine R et un microorganisme exprimant une protéine Avr est spécifique et aboutit à la mise en place d'une résistance race/cultivar.

La sélection naturelle a, par la suite, conduit les agents pathogènes à éviter l'ETI en éliminant ou diversifiant l'effecteur reconnu, ce qui aboutit à un nouveau phénomène d'ETS (**Figure 12**). L'évolution du système immunitaire de la plante peut donc être représentée par un modèle en zigzag constitué de quatre phases (**Figure 10**). La résistance liée à un gène R est souvent surmontée après quelques années d'usage agricole (Collmer et al. 2009).

2.2.3 Résistances locales et systémiques mises en place par la plante

Suite à une ETI ou une PTI, des cascades de signalisation sont déclenchées au niveau cellulaire et aboutissent à une activation des réponses de défense. Ceci aboutit généralement à une HR (Hypersensitive Response), mort cellulaire programmée des cellules infectées, ce qui permet de restreindre le développement de l'agent pathogène au site d'infection. Un autre type de résistance locale, la LAR (Localized Acquired Resistance) peut ensuite être mise en place dans les cellules vivantes voisines du site d'infection, elle découle de la HR et est caractérisée par l'activation de gènes de défense et la production de métabolites secondaires (Costet et al. 1999; Dorey et al. 1997). Ces résistances locales peuvent induire une résistance s'exprimant dans les tissus non inoculés au niveau de la plante entière, la SAR (Systemic Acquired Resistance), dont l'intensité est plus faible mais qui permet de protéger la plante contre un large spectre d'agents pathogènes. Ce phénomène indique qu'il y a production et transport d'un signal du lieu de l'infection vers l'ensemble des organes de la plante. Il n'a pas été clairement établi quelles molécules sont porteuses du signal, bien qu'il soit plutôt associé à la voie de l'acide salicylique et à la résistance aux agents (hémi)biotrophes. Le système de régulation de la SAR apparaît ainsi complexe et met en jeu différentes voies de signalisation (Dempsey et Klessig 2012).

Certaines souches bactériennes non pathogènes (comme *Pseudomonas fluorescens*) présentes dans la rhizosphère peuvent coloniser les racines des plantes et stimuler la mise en place d'un autre type de résistance systémique appelée ISR (Induced Systemic Resistance). Comme la SAR, l'ISR permet à la

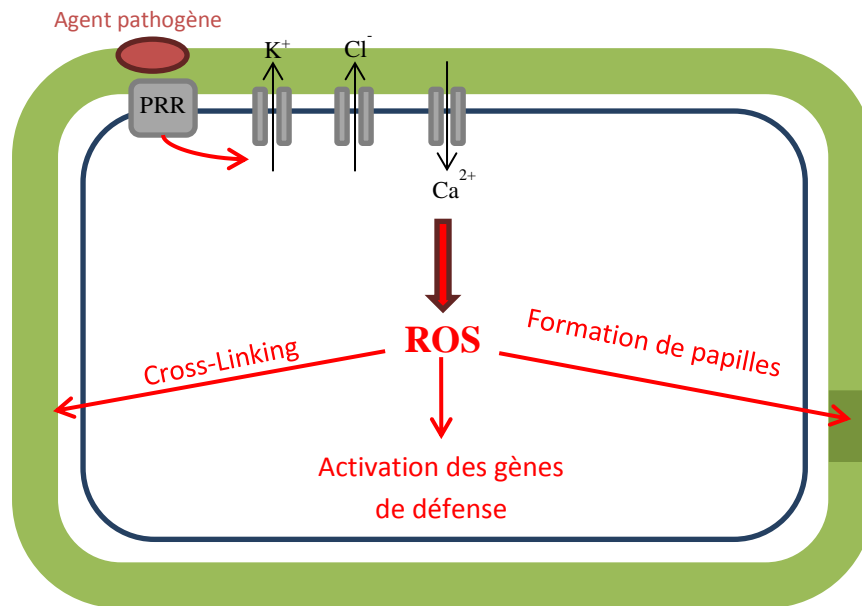


Figure 13 : Cascade de réaction suite à l'identification d'un agent pathogène : événements précoces de signalisation suivis d'un renforcement des parois cellulaires et d'une activation des gènes de défense

ROS : reactive oxygen species ; PRR : pattern recognition receptor

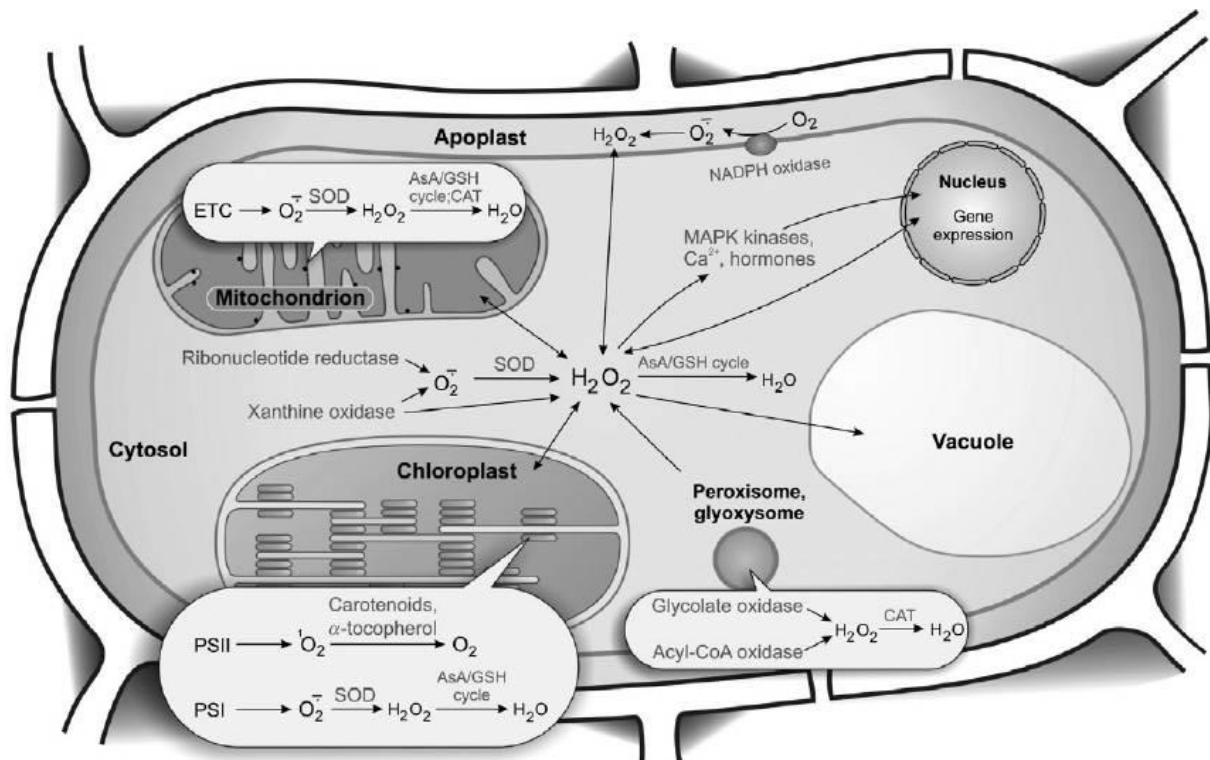


Figure 14 : Production et transformation des ROS dans les différents compartiments de la cellule (Gadjev et al. 2008)

AsA/GSH : acide ascorbique/glutathion ; CAT : catalase ; ETC : chaîne de transport d'électrons ; PSI : photosystème I ; PSII : photosystème II ; SOD : superoxyde dismutase

plante de se défendre plus efficacement en cas d'attaque ultérieure. L'ISR est régulée par l'éthylène et l'acide jasmonique et (Choudhary et al. 2007).

2.3 Événements précoces de signalisation

Dès que la présence d'un agent pathogène a été détectée, une cascade de transduction de signaux de défenses est activée par la plante. La capacité de défense de la plante dépend entre autres de sa rapidité à mettre en place ces réponses.

2.3.1 Modification des flux ioniques

Les premières modifications liées à la mise en place des réponses de défense de la plante concernent la perméabilité membranaire aux ions, les ions Calcium sont accumulés à l'intérieur des cellules tandis que les ions Chlorure et Potassium en sortent (**Figure 13**). L'ion Ca^{2+} est particulièrement déterminant pour la suite de la cascade d'activation, car il est nécessaire à la production de formes actives d'oxygène, l'activation des gènes de défense et la production de phytoalexines (Hahlbrock et al. 1995). L'étude des réactions de défense de nombreuses plantes a été étudiée via l'application d'éliciteurs, molécules capables d'activer au moins l'une des réponses typiques de défense des plantes, et ce sans infection. Par exemple, l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} est un paramètre variable selon le type d'infection et même le type d'éliciteur. Il a été montré qu'en faisant varier l'activation des réponses de défense dans des cellules de *Nicotiana plumbaginifolia* avec deux éliciteurs différents issus d'un même agent pathogène, l'évolution de la concentration en Ca^{2+} diffère en terme d'intensité, de cinétique et de durée (Lecourieux et al. 2006).

2.3.2 Production d'espèces activées de l'oxygène

Suite à cette augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans les cellules, la production d'espèces activées d'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species) est déclenchée. La production des ROS via la consommation d'oxygène est appelée « burst » oxydatif. Les ROS sont produites dans tous les compartiments cellulaires (**Figure 14**) par l'action de différentes enzymes. La production de $\text{O}_2^{\bullet-}$ est majoritairement catalysée par des NADPH oxydases localisées dans la membrane plasmique, mais les ribonucléotides nucléases ainsi que les xanthine oxydases sont également impliquées dans cette synthèse (Gadjev et al. 2008). $\text{O}_2^{\bullet-}$ est facilement dismuté en H_2O_2 par la voie non enzymatique, ou par l'action de superoxyde dismutases (SOD) (Sharma et al. 2012). Les ROS peuvent également être



Figure 15 : Effet d'une élicitation avec une laminarine sulfatée (PS3) sur les symptômes liés à une inoculation de disques foliaires de *V. vinifera* cv Marselan par *Plasmopara viticola* (Trouvelot et al. 2008)

générées par des peroxydases pariétales et des amine oxydases. La production dans l'apoplasme du superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et de son produit de dismutation H_2O_2 est réalisée en deux phases : une phase transitoire de faible amplitude suivie d'une phase durable et d'amplitude plus importante. Il a par ailleurs été montré que certains agents pathogènes virulents sont capables de supprimer la phase durable de production des ROS (Lamb et Dixon 1997).

Ces molécules sont toxiques pour l'agent pathogène, mais également pour la plante dont les cellules subissant ces modifications meurent. Il se forme alors un point de nécrose dans le tissu végétal lié à un processus de mort cellulaire programmée, la HR. Outre sa toxicité directe, l'augmentation de la concentration en H_2O_2 permet également de renforcer les parois végétales via l'action de peroxydases impliquées dans la synthèse de lignine (Hückelhoven 2007) ainsi que l'activation de gènes impliqués dans les réponses de défense (**Figure 13**) (Torres et al. 2006). Afin de réduire l'activité oxydante dans les cellules, H_2O_2 peut ensuite être transformé en H_2O par trois enzymes : la catalase (CAT), la guaiacol peroxydase (GPX) et l'ascorbate peroxydase (APX) (Sharma et al. 2012).

Chez la vigne, l'étude des mécanismes précoces de défense a été principalement réalisée via l'application d'éliciteurs comme la laminarine ou une polygalacturonase fongique. Sur culture cellulaire de vigne, l'application de ces éliciteurs provoque un « burst » oxydatif, une augmentation intracellulaire de la concentration en ions calcium, et ce rapidement et transitoirement (Aziz et al. 2003; Poinssot et al. 2003). L'application d'une laminarine sulfatée (PS3) sur des feuilles de vigne a également permis de montrer que la vigne, en réaction de défense, produit de l' H_2O_2 au site d'infection, il y a également production de callose et dépôts de composés phénoliques au site d'application de l'éliciteur. La réponse de la vigne à cette élicitation est une HR (Trouvelot et al. 2008). L'application de cet éliciteur permet à un cépage sensible de résister à une infection ultérieure par *P. viticola* (**Figure 15**). L'utilisation de traitements à base d'autres éliciteurs comme la thiamine (vitamine B1) montre également une augmentation de la production de H_2O_2 dans des suspensions cellulaires et des feuilles de *V. vinifera* (Boubakri et al. 2012).

2.3.3 MAP kinases

Les MAP (Mitogen Activated Protein) kinases ont un rôle essentiel dans la cascade de signalisation activée en réponse à une agression parasitaire. Suite à la reconnaissance d'un agent pathogène ou d'un éliciteur, une activité MAP kinase est détectée (Pedley et Martin 2005). Ces MAP kinases appartiennent à des familles multigéniques et sont organisées en réseaux complexes permettant la transmission de différents stimuli (Mishra et al. 2006). Les événements de phosphorylation et de

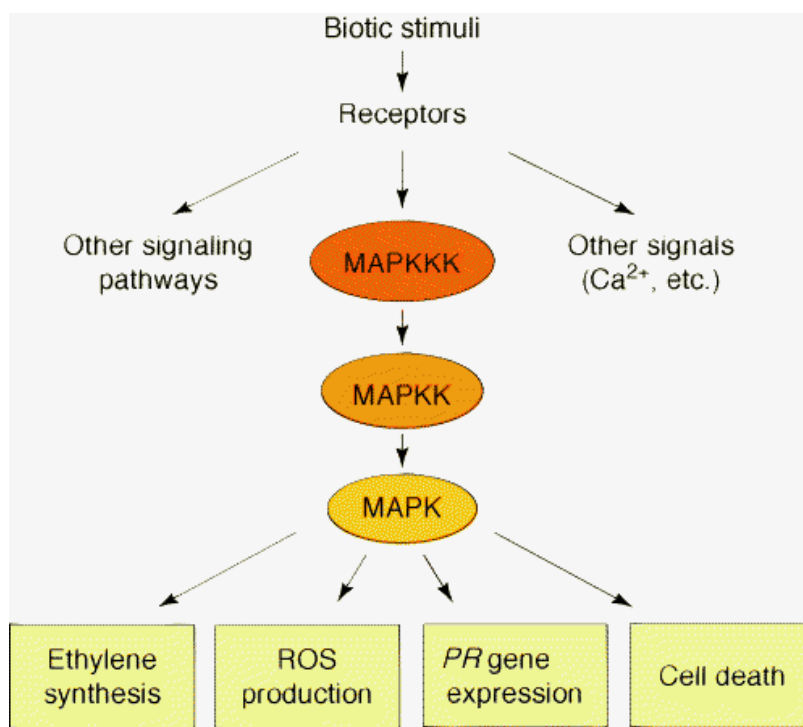


Figure 16 : Cascade de signalisation liée aux MAP kinases (Pedley et Martin 2005). MPK : MAP kinase

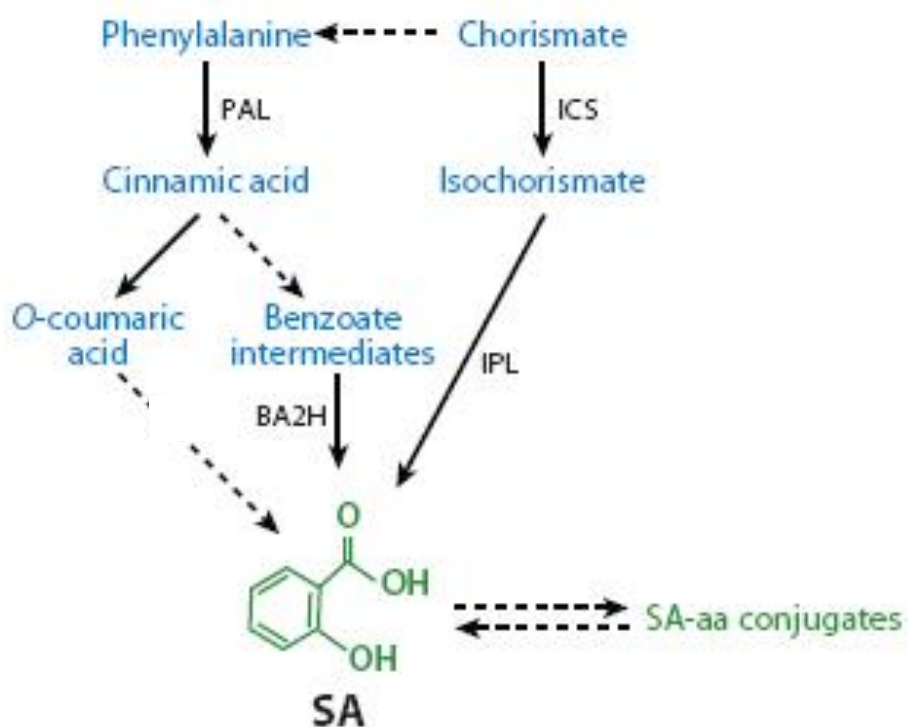


Figure 17 : Voies de biosynthèse de l'acide salicylique chez les plantes (Vlot et al. 2009)

SA : Acide salicylique ; PAL : phénylalanine-ammonia-lyase ; ICS : isochorismate synthase ; BA2H : benzoic acid-2-hydroxylase

déphosphorylation constituent un signal reconnu par la plante et déclenchant la suite des réactions de défense (**Figure 16**). Par exemple, il a été montré que l'activation de la cascade MAP kinase chez *Arabidopsis* par la flagelline, un composé du flagelle bactérien hautement conservé, lui confère une résistance à des agents pathogènes bactériens et fongiques (Asai et al. 2002).

2.4 Signaux secondaires de nature hormonale

A la suite de la reconnaissance de l'agresseur, plusieurs voies de signalisation peuvent être stimulées et dépendent de trois principaux signaux (Pieterse et al. 2009; Thomma et al. 2001): l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Ces signaux vont induire différents sous-groupes de gènes de défense qui sont à l'origine de la résistance de la plante à différents agresseurs.

2.4.1 Acide salicylique : rôle et voies de biosynthèse

Il a été démontré que le SA contrôle une voie de signalisation nécessaire à la résistance locale aux agents pathogènes biotrophes et à la mise en place de la SAR (Glazebrook 2005; Pieterse et al. 2009). Ce phénomène survenant suite à la reconnaissance de l'agent pathogène et à l'activation des réponses de défense précoces et locales par la plante est un signal de défense systémique. Il permet à la plante de mettre en place sa défense dans l'ensemble de ses organes et ainsi de prévenir d'autres attaques par des agents pathogènes. Il a été montré que la mise en place de la SAR est associée à l'augmentation des taux de SA à la fois au niveau du site de l'infection et dans l'ensemble des tissus de la plante (Glazebrook 2005). Cette voie de signalisation régulée par l'hormone SA est nécessaire à l'activation de gènes codant certaines protéines « Pathogenesis Related » (PR) présentées ultérieurement (Pieterse et al. 2009). Deux voies de biosynthèse sont à l'origine de la synthèse de SA (**Figure 17**), la première est celle des phénylpropanoïdes, via l'activité de la PAL (Phénylalanine-Ammonia-Lyase) et la seconde est la voie du chorismate via l'action d'isochorismate synthases (Vlot, Dempsey, et Klessig 2009).

2.4.2 Acide jasmonique et éthylène: rôles et voies de biosynthèse

La recherche sur des mutants déficients en production de JA ou d'ET a permis de mettre en évidence l'implication de ces deux phytohormones dans la mise en place des réactions de défense par les plantes (Thomma et al. 1998; Broekaert et al. 2006). Il a été montré chez *Arabidopsis* que le JA et l'ET jouent un rôle essentiel dans la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes tels que *Botrytis*

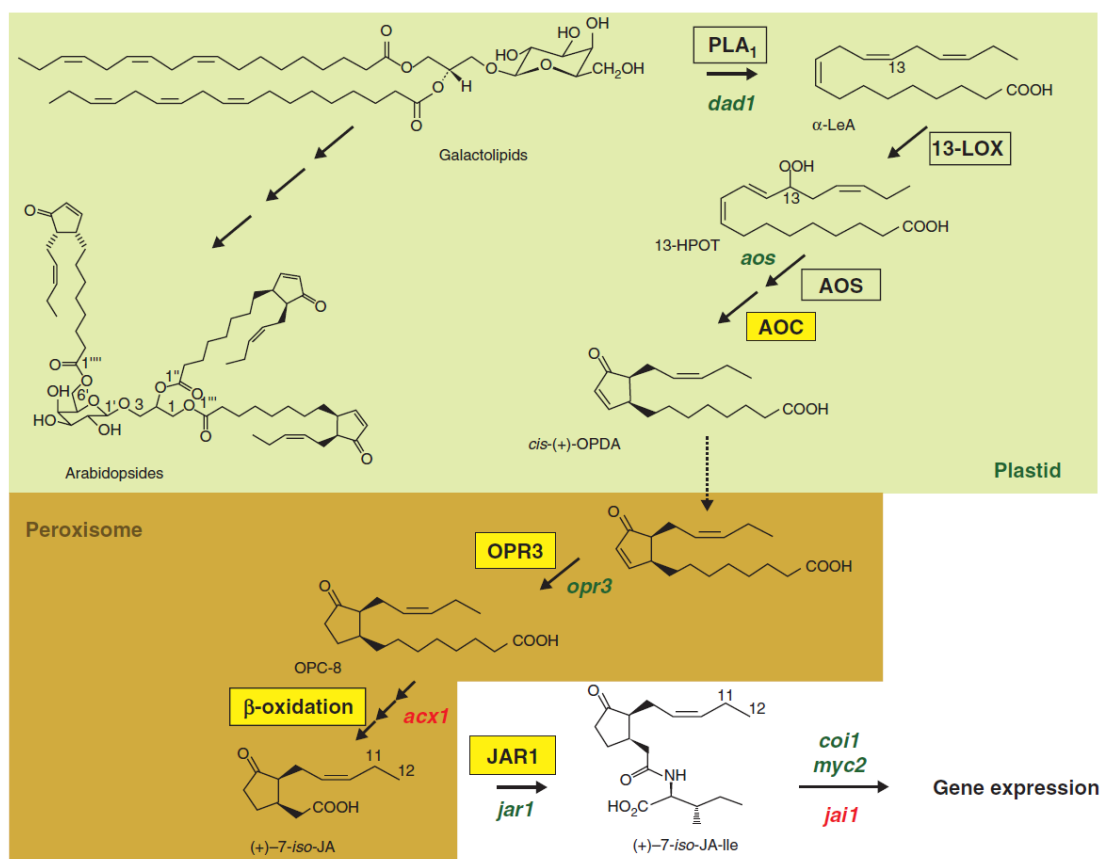


Figure 18 : Biosynthèse de l'acide jasmonique, transformation de l'acide linoléique par l'action de différentes enzymes (Wasternack et Hause 2013)

PLA1: phospholipase A₁; 13-LOX: 13-lipoxygénase; AOS: allène oxyde synthase; AOC: allène oxyde cyclase; OPR3: OPDA reductase3; JAR1 : JA-amino acide synthétase

cinerea et *Alternaria brassicicola* ainsi que dans la mise en place du phénomène d'ISR (Thomma et al. 1998; Pieterse et al. 2009). Ces deux molécules sont décrites comme ayant des actions synergiques pour l'activation de gènes de défense. L'acide jasmonique dérive de l'acide linoléique, généré à partir des galactolipides par une phospholipase A₁. L'oxydation de l'acide linoléique est la première étape conduisant à la synthèse de JA (**Figure 18**), elle est réalisée via l'action d'une lipoxygénase. Deux enzymes, l'allène oxyde synthase et l'allène oxyde cyclase permettent ensuite la cyclisation de la molécule. Puis, différentes modifications catalysées par une réductase ainsi qu'une oxydase permettent d'aboutir au JA (Wasternack et Hause 2013). Il a cependant été montré qu'un conjugué du JA, le (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile) constitue le signal actif chez la plante (Fonseca et al. 2009), sa synthèse est réalisée par l'enzyme JA-amino acid synthétase.

La synthèse de l'ET est sous le contrôle d'une ACC (acide 1-aminocyclopropanoïque) synthase qui permet la conversion de la S-adenosyl méthionine en ACC, puis d'une ACC oxydase transformant l'ACC en ET (Wang, et al. 2002).

2.4.3 Interconnexions et régulations entre les différentes voies hormonales et autres phytohormones

L'activation de la voie du SA ou de la voie du JA-ET dépend en fait de la nature du parasite attaquant la plante. La voie du SA est activée lors de la détection d'agents pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes, tandis que la détection d'agents nécrotrophes déclenche la voie du JA et de l'ET (Pieterse et al. 2009). Ces deux voies sont antagonistes; l'augmentation de la concentration en SA entraîne une inhibition de la voie JA-ET et inversement, tandis que les voies du JA et de l'ET peuvent agir de manière synergique (**Figure 19**). La mise en place des réactions de défense est coûteuse en énergie pour la plante, ce mécanisme est appelé coût de « fitness ». Aussi, la plante a besoin de mécanismes fins de régulation des réponses afin de produire une réponse adaptée aux attaques par les agents pathogènes sans engager de surplus d'énergie (Pieterse et al. 2009; Thomma et al. 2001). Les différentes pressions de sélection subies par les plantes ont permis la mise en place de ces signaux hormonaux de régulation des mécanismes de défense basés sur le SA, le JA et l'ET.

Ces régulations croisées sont dépendantes de l'action de protéines particulières. La MAP kinase 4 identifiée chez *Arabidopsis* par exemple, composant important de la transduction des signaux, est un régulateur positif de la voie du JA et un inhibiteur de la voie du SA (Kong et al. 2012). La protéine NPR1 (non expressor of pathogenesis related protein 1) a été largement étudiée chez *Arabidopsis*, car elle constitue une protéine clé de la voie de signalisation dépendante du SA, ainsi que dans l'inhibition de la voie du JA (Durrant et Dong 2004).

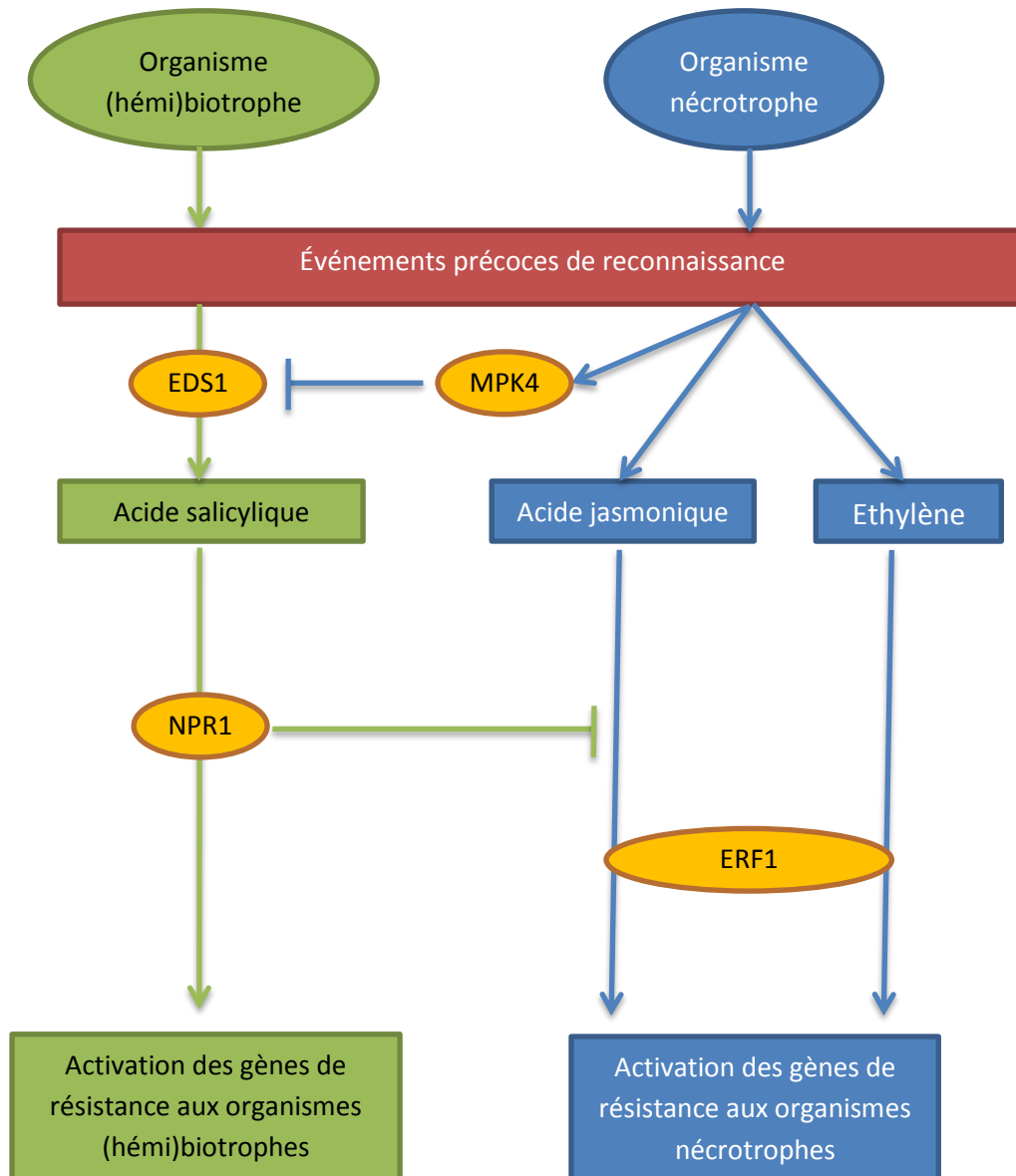


Figure 19 : Régulation croisée des signaux de défense hormonaux liés à l'attaque de la plante par des agents pathogènes biotrophes ou nécrotrophes, (représentation simplifiée d'après Pieterse et al. 2009)

EDS1 : Enhanced Disease Susceptibility 1 ; MPK4 : MAP kinase 4 ; NPR1: Non expressor of Pathogenesis Related Protein 1; ERF1: Ethylene response Factor 1

Chez la vigne, l'acquisition de la séquence complète du génome (Jaillon et al. 2007) a permis d'identifier des gènes présentant des similarités avec des gènes de signalisation des réponses de défense, dont une famille multigénique homologue à la famille NPR1 identifiée chez *Arabidopsis* (Bergeault et al. 2010; Velasco et al. 2007) et jouant un rôle majeur dans la voie régulée par le SA. La surexpression d'un de ces gènes chez la vigne lui permet d'augmenter ses capacités à se défendre contre *Erysiphe necator*, l'agent de l'oïdium (Le Henanff et al. 2011). Des travaux récents ont également montré que la surexpression d'un facteur de transcription de type WRKY chez la vigne permet d'activer la voie régulée par le JA et l'expression de gènes de défense, conduisant à une amélioration de la résistance à *P. viticola* (Marchive et al. 2013).

Bien que longtemps attribuées à différents processus physiologiques de la plante, différentes phytohormones comme l'acide abscissique, l'acide gibbérellique et l'auxine sont également impliquées dans la réponse aux stress biotiques. Ces hormones sont produites différenciellement par des plantes en réponse à des infections. Certains agents pathogènes sont également capables de produire des analogues de ces hormones pour dérégler l'équilibre hormonal de la plante et donc supprimer sa capacité à se défendre (Robert-Seilanianz et al. 2007; Vandeputte et al. 2005).

2.5 Expression de la résistance

2.5.1 Renforcement des parois cellulaires

La paroi cellulaire est un lieu critique lors de l'infection par des agents pathogènes, car elle n'est parfois pas suffisante pour freiner leur développement dans la plante. La production de ROS par la cellule attaquée entraîne une augmentation de leur concentration au niveau pariétal. Leur présence conjointement à celle de peroxydases modifie les parois cellulaires : le phénomène de « cross-linking » oxydatif est responsable de l'augmentation des liaisons entre protéines pariétales, ce qui renforce les caractéristiques physiques des parois (Brown et al. 1998; Brisson et al. 1994). La présence des ROS favorise également l'incorporation de composés phénoliques dans les parois et représente un signal pour les cellules voisines. En effet, il a été montré que lorsque des cellules étaient attaquées et dégradées par des agents pathogènes, les cellules proches du site d'infection répondaient à l'attaque microbienne en synthétisant rapidement de la callose et de la lignine entre leur paroi et celle des cellules infectées (O'Brien et al. 2012; Asselbergh et al. 2007). Ces dépôts sont appelés papilles et permettent d'une part de limiter la progression des agents pathogènes dans la plante et d'autre part de contenir le parasite afin de pouvoir l'éliminer à travers l'action des ROS et des métabolites toxiques produits en réponse à l'infection.

Chez la vigne, l'application de différents éliciteurs ou potentialisateurs comme l'acide β -aminobutyrique ou la thiamine a entraîné l'augmentation des dépôts de callose sur les parois de cellules de vigne en réponse au traitement. Dans les deux cas, la vigne élicitée était plus résistante à une infection par *P. viticola* (Hamiduzzaman et al. 2005; Boubakri et al. 2012).

2.5.2 Protéines « Pathogenesis Related »

L'accumulation de protéines PR (Pathogenesis Related) fait également partie de la batterie de défenses mises en place par la plante. Ces protéines sont ainsi nommées, car elles ne sont pas détectables (ou à des taux très faibles) dans les tissus végétaux sains tandis qu'elles sont accumulées par des plantes en conditions de stress biotique pour au moins deux types d'interactions plante-pathogène (Sels et al. 2008). Dix-sept familles de protéines PR ont été répertoriées chez différentes plantes comme le tabac, la tomate ou *Arabidopsis* et certaines ont également été identifiées chez la vigne (Bézier et al. 2002; Kortekamp 2006). Ces familles regroupent des protéines ayant des activités particulières. Certaines possèdent des propriétés antimicrobiennes, c'est le cas des chitinases (PR-3, 4, 8, 11), des β -1,3-glucanases (PR-2) qui sont capables de dégrader la paroi de champignons phytopathogènes et des peptides cationiques qui perméabilisent les membranes (Van Loon et al. 2006). D'autres protéines PR ont été identifiées comme des osmotines, qui en s'accumulant modifient le potentiel hydrique des cellules ; des thaumatine-like (PR-5) dont le mode d'action va de l'activité β -1,3-glucanases à la perméabilisation des membranes (Hu et Reddy 1997) ; des inhibiteurs de protéases (PR-6) ; des défensines (PR-12), petits peptides riches en cystéines dont le mode d'action est très varié ; ou des protéines de transfert de lipides (PR-14).

Chez la vigne, différentes études ont pu mettre en évidence l'intérêt de la production des protéines PR en réponse à des attaques parasitaires. Une étude récente a mis en évidence une famille de défensines (PR-12) dont certaines sont exprimées majoritairement en réponse à une infection, elles permettent par exemple d'inhiber *in vitro* la germination des conidies de *B. cinerea* (Giacomelli et al. 2012). Lors d'une infection par différents agents pathogènes, les chitinases (PR-3,4,8,11) sont exprimées différenciellement selon le type d'attaque et sont associés à une résistance de la plante (Robert et al. 2002). Il a également été montré que chez la vigne, l'expression de certains gènes codant des protéines PR est particulièrement importante lors de la véraison ; la chitinase (PR-3) et la thaumatine-like (PR-5) en sont les principales représentantes. Leur présence à des stades avancés de la maturation des baies expliquerait la résistance à certains agents pathogènes malgré l'augmentation des teneurs en sucre (Tattersall et al. 1997).

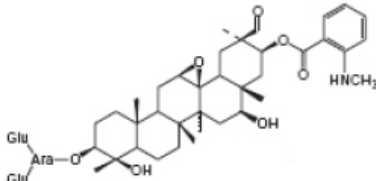
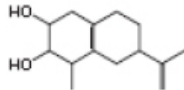
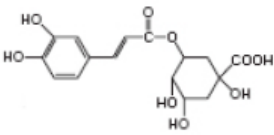
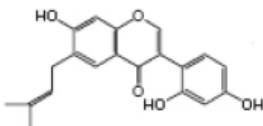
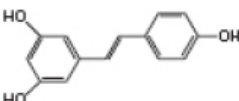
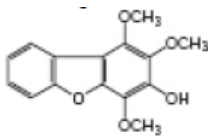
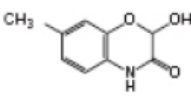
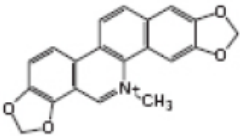
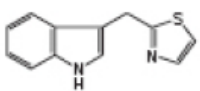
2.6 Activation du métabolisme secondaire

Contrairement aux métabolites primaires qui sont indispensables à la survie de la plante, les métabolites secondaires sont produits en tant que réponse de la plante à son environnement biotique et abiotique. Ils peuvent être synthétisés pour permettre à la plante de s'adapter à son environnement, d'améliorer la reproduction en attirant les insectes pollinisateurs, mais également de se défendre face à des agressions parasitaires (Vogt 2010). On distingue trois différents types de métabolites secondaires : composés soufrés et azotés dérivant des acides aminés, les terpénoïdes dérivant de l'isopentenyl diphosphate (IPP) et les phénylpropanoïdes dérivant de l'acide shikimique (Herrmann 1995). Les métabolites secondaires sont des molécules largement étudiées, car certaines d'entre elles ont des propriétés intéressantes pour la médecine. Parmi les métabolites secondaires, certains composés de faible poids moléculaire sont synthétisés en cas d'attaque par des agents pathogènes, ils sont appelés phytoalexines ; tandis que d'autres sont préformés dans les cellules ou transformés après l'infection à partir de composés pré-existants, ils sont par opposition appelés phytoanticipines (VanEtten et al. 1994). La différenciation entre ces deux types de composés est peu évidente car elle est basée sur leur fonction et non leur structure. Dans certains cas, des composés peuvent appartenir aux deux classes (VanEtten et al. 1994).

Parmi les phytoanticipines les mieux étudiées, on peut citer notamment les saponines comme l'avénacine chez l'avoine, les glucosides de benzoxazinone comme le 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one ou DIMBOA chez l'orge et des glucosinolates des Brassicacées (Bednarek et al. 2009). La nature chimique des phytoalexines est très variée, les plus connues étant les isoflavonoïdes des légumineuses comme la phaséoline du haricot ou la pisatine du pois, les sesquiterpénoïdes des Solanacées comme la rishitine du tabac ou les stilbènes dérivés de la voie des phénylpropanoïdes tels que le resvératrol chez la Vigne (Dixon 2001).

Les métabolites secondaires peuvent permettre à la plante de se défendre contre des attaques parasitaires de différentes manières. D'une part, ils peuvent agir de manière directe contre l'agent pathogène de par leur toxicité. Par exemple, leur action antifongique peut permettre d'empêcher la germination, la pénétration dans l'hôte ou la colonisation des vaisseaux vasculaires de la plante (Jeandet et al. 2002; Adrian et al. 1997), certains métabolites secondaires sont également bactéricides ou virucides (Francis et al. 2002; Chan et al. 2013). Une activité toxique directe des métabolites secondaires a également été rapportée chez les insectes et les mammifères. Par exemple, certaines molécules sont capables d'interférer avec le processus de mue chez les insectes (Sláma 1980), d'autres sont capables de se lier aux protéines et de perturber leur action (Bennick 2002), et certaines sont irritantes pour la peau (Jassbi 2006). Outre cette activité toxique directe,

Tableau 1: Familles de phytoalexines et de phytoanticipines, illustration par différentes molécules retrouvées chez les plantes (d'après Dixon 2001).

	Phytoanticipines	Phytoalexines
Terpénoïdes	Saponine:  Avenacine	Sesquiterpène:  Rishitine
Phénylpropanoïdes	Ester d'acide hydroxycinnamique:  Acide chlorogénique Isoflavone:  Lutéone	Stilbène:  Resvératrol Benzofurane:  Benzofurane
Composés soufrés ou azotés	Benzoxazinone:  DIMBOA	Alcaloïde:  Sanguinarine Indole:  Camalexine

certaines métabolites secondaires permettent aux plantes de se protéger en agissant comme répulsif contre les oiseaux ou les rongeurs par exemple (Willoughby et al. 2011; Fischer et al. 2013). D'autre part, certains métabolites secondaires sont impliqués dans la défense des plantes par leur action en tant que molécules signal, dont les plus étudiées sont l'acide jasmonique et l'acide salicylique (Edreva et al. 2008). Enfin, certains métabolites secondaires sont capables de réagir avec des ROS, ce qui leur confère donc un rôle d'anti-oxydant et permet à la plante de maintenir l'homéostasie redox cellulaire (Pourcel et al. 2007; Foyer et Noctor 2005). Différentes familles moléculaires représentent les phytoalexines et les phytoanticipines, elles sont illustrées par des exemples dans le **tableau 1**.

Pour la suite de cette synthèse bibliographique, nous nous sommes focalisés sur deux familles de composés dont nous détaillons le rôle et les voies de biosynthèse: les phénylpropanoïdes (d'où dérivent les stilbènes, principales phytoalexines de la vigne) et les terpénoïdes, dont particulièrement les saponines.

2.6.1 Métabolisme des phénylpropanoïdes

2.6.1.1 Rôle des phénylpropanoïdes dans les réponses de défense

Les rôles joués par les différents métabolites secondaires ayant été listés dans le point précédent, ce paragraphe illustrera ces activités avec des exemples décrits dans la littérature.

La lignine est un phénylpropanoïde permettant le renforcement des barrières physiques, la synthèse des enzymes impliquées dans la synthèse de lignine est induite lors des réactions de défense (Dixon et Paiva 1995). Il a également été montré que la mutation d'une O-méthyltransférase impliquée dans la synthèse de la lignine entraîne une plus forte sensibilité de *A. thaliana* aux attaques bactériennes et fongiques de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *B. cinerea*, *Alternaria brassicola* et *Blumeria graminis* (Quentin et al. 2009).

Les composés phénoliques sont les principales molécules connues pour leur activité antioxydante, propriété largement exploitée dans la pharmacologie et la cosmétologie. Cette activité peut survenir chez la plante sous l'action d'enzymes, mais également par piégeage direct des radicaux libres. Une coumarine, la scopolétine, a par exemple été mise en évidence comme molécule participant à la limitation du « burst » oxydatif et ayant une capacité à piéger les ROS lors d'une HR induite par le virus de la mosaïque du tabac (Chong et al. 2002). Les flavonoïdes peuvent également piéger les ROS sous l'action de laccases et de catéchol oxydases (Pourcel et al. 2007).

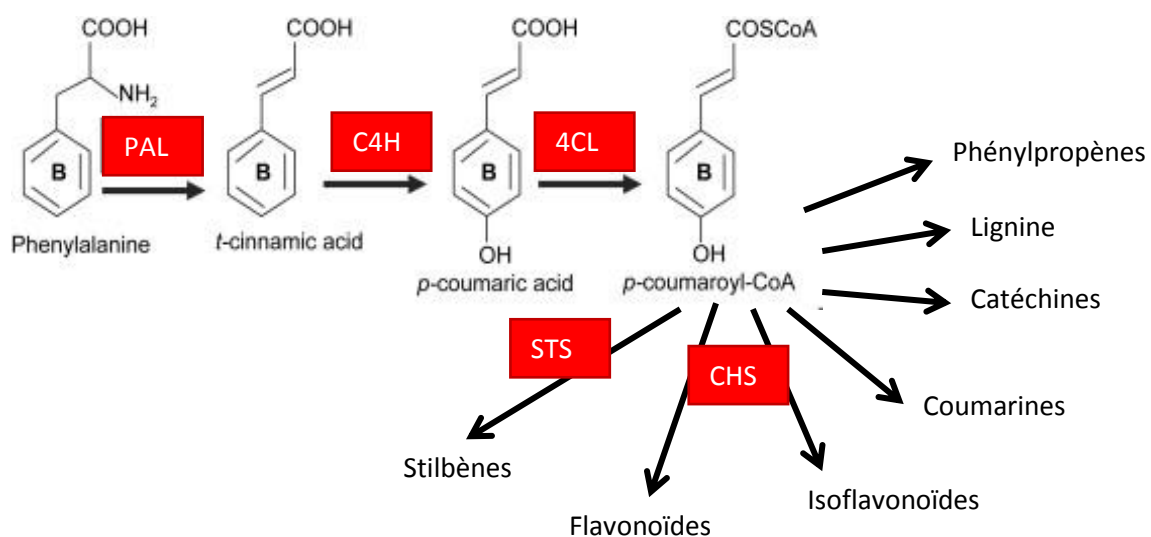


Figure 20 : Voie de synthèse des phytoalexines issues de la voie des phénylpropanoïdes (d'après Arfaoui et al. 2007; Vogt 2010)

PAL : Phénylalanina ammonia-lyase ; C4H : Cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4 CoumaroylCoA ligase;
STS: Stilbène synthase; CHS: Chalcone synthase

Les composés issus de la voie des phénylpropanoïdes sont également connus pour leur activité directement toxique envers les agents pathogènes. En général, les données fournies dans la littérature sont des corrélations positives entre une augmentation de la production du métabolite secondaire par la plante et une meilleure résistance de cette dernière à des attaques parasitaires. Par exemple, la stimulation par transgénèse chez la luzerne de la synthèse de deux isoflavonoïdes (la formonétine et la médicarpine) entraîne une augmentation de la résistance de cette plante à *Phoma megicaginis* (He et Dixon 2000). Une démonstration directe du rôle des phytoalexines dans la résistance aux bioagresseurs a été obtenue par l'expression d'un gène de stilbène synthase de vigne dans des tabacs transgéniques; ces plantes deviennent capables de synthétiser du resvératrol et se montrent plus résistantes à *B. cinerea* (Hain et al. 1993). Suite à ces travaux, des gènes codant des stilbène synthases ont été exprimés dans diverses plantes incapables de produire naturellement des stilbènes, ces plantes transformées ont développé une meilleure tolérance à différents types d'agents pathogènes (Chong et al. 2009). Outre son activité antimicrobienne, le resvératrol pourrait également jouer un rôle dans l'induction de la mort cellulaire programmée de type HR dans des cellules de vigne élicitées (Chang et al. 2011).

De façon indirecte, certaines molécules issues de la voie des phénylpropanoïdes sont également capables d'agir en tant que signal allélochimique, en dégageant une odeur répulsive pour éloigner les parasites de la plante. C'est le cas de la pinosylvine, 3-O-méthyl éther produite par l'aulne (*Alnus crispa*), qui, lorsqu'elle est accumulée en grande quantité dans les bourgeons, lui permet de se protéger des rongeurs (Bryant et al. 1983).

2.6.1.2 Voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes

De nombreuses phytoalexines dérivent de la voie des phénylpropanoïdes, cette voie découle de la phénylalanine qui est transformée en acide *t*-cinnamique par l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL). L'acide *t*-cinnamique est transformé en acide *p*-coumarique par la cinnamate-4-hydroxylase, et la synthèse du *p*-coumaroyl coenzymeA est ensuite réalisée sous l'action de la 4 coumaroylCoA ligase (Ehltling et al. 2006; Ferrer et al. 1999; MacDonald et D'Cunha 2007). De cette dernière molécule dérivent toutes les phytoalexines connues. Les coumarines et les stilbènes (resvératrol, viniférines, ptérostilbènes et picéïdes) dérivent de l'activité des stilbène synthases alors que les flavonoïdes et isoflavonoïdes sont formés via l'action des chalcone synthases (revue de Chong et al. 2009) (**Figure 20**).

La structure de chacune de ces phytoalexines n'est pas forcément liée à une activité biologique particulière. Des molécules très différentes peuvent avoir des activités très similaires sur des agents

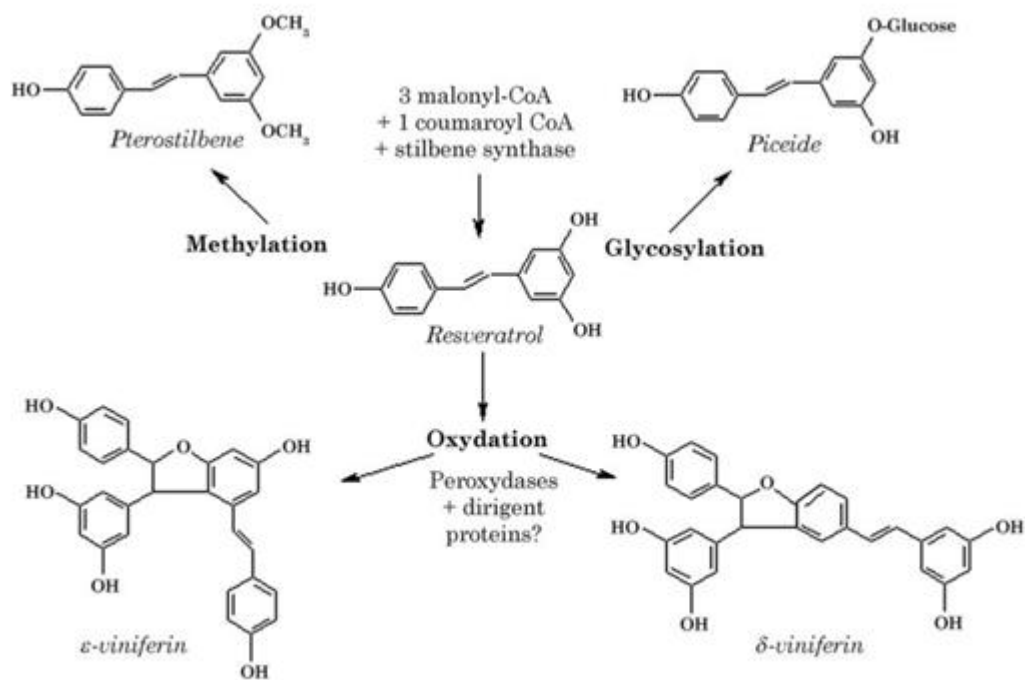


Figure 21: Le resvératrol et ses dérivés chez la vigne (Pezet et al. 2004)

pathogènes, comme une activité fongicide ou fongistatique. Le fait que les phytoalexines partagent toutes des caractéristiques lipophiles pourrait expliquer ce phénomène. En effet, dans l'environnement aqueux de la plante, ces molécules sont plus rapidement mises en contact des membranes fongiques (Harborne 1999).

2.6.1.3 Métabolisme des phénylpropanoïdes chez la vigne

Chez la vigne, les réactions de défense les plus observées lors d'attaques parasitaires sont l'accumulation de molécules dérivant de la voie des phénylpropanoïdes et la synthèse de protéines PR. Chez cette espèce, la diversité des phytoalexines est restreinte et se limite quasiment à la famille des stilbènes dont le squelette de base est le *trans*-resvératrol. Suite à l'étape de synthèse de *p*-coumaroyl-coA, l'action de stilbène synthases permet la formation de stilbènes simples (Jeandet et al. 2002). Alors que la famille multigénique des stilbène synthases comprend généralement de 2 à 5 paralogues, chez la vigne cette famille est représentée par un nombre plus important de gènes dont 32 sont potentiellement codants (Parage et al. 2012).

Les principaux stilbènes formés chez la vigne sont le resvératrol, les viniférines (oligomères du resvératrol), les picéides (resvératrol glycosylé) et le ptérostilbène (resvératrol méthylé) (**Figure 21**) (Pezet et al. 2004). Le resvératrol est une molécule particulièrement étudiée car elle est supposée être impliquée dans le « french paradox ». Ce phénomène observé particulièrement en France correspond au fait que les personnes consommant raisonnablement du vin rouge auraient moins de chances de développer des maladies cardio-vasculaires que les autres (Renaud et de Lorgeril 1992). Ces molécules sont également connues pour leur activité antibactérienne et antifongique. Chez la vigne, il a été montré une corrélation positive entre le niveau de résistance de certains cépages et leur contenu en stilbènes ; les tests ont principalement été réalisés après inoculation par *Botrytis cinerea* et *Plasmopara viticola* (Sbaghi et al. 1995; Malacarne et al. 2011). Il a par ailleurs été montré que suivant la modification subie par le resvératrol, la résistance de la vigne à une infection par *P. viticola* diffère. Par exemple, des plants sensibles à une infection par *P. viticola* sont caractérisés par une forte production de picéides, dérivés glycosylés peu toxiques, tandis que les plants résistants produisent de forts taux de viniférines, polymères du resvératrol à forte activité antimicrobienne (Pezet et al. 2004). Ceci indique que le type de phytoalexines produites par la vigne est particulièrement déterminant pour sa résistance face à des agents pathogènes majeurs.

Chez la vigne, les études se sont principalement intéressées à l'influence des stilbènes produits dans la résistance aux agents pathogènes. Cependant, certaines phytoanticipines ont également un rôle important dans la limitation des maladies. C'est le cas des flavonols, composés constitutifs des feuilles de vigne, qui pourraient permettre de ralentir l'infection par *P. viticola* (Latouche et al. 2013).

2.6.2 Métabolisme des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes

2.6.2.1 Rôle des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes dans la défense des plantes

Les mono et sesquiterpènes sont les composés primaires des huiles essentielles extraites des végétaux. Ce sont des composés volatiles qui contribuent en général à la fragrance des plantes qui les produisent. L'activité de ces composés a été particulièrement caractérisée dans des interactions hôte-insecte (Paré et Tumlinson 1999).

Par exemple, un monoterpène, le phellandrène, a une action insecticide contre *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae*, deux insectes ravageurs des céréales (Park et al. 2003). Un autre monoterpène, le limonène, agit comme répulsif et est produit par certains conifères subissant les attaques d'insectes (Moreira et al. 2013). Les pyréthrinés sont des esters de monoterpènes produits par *Tanacetum cinerariifolium*, l'action neurotoxique de ces molécules contre les insectes fait qu'elles sont très étudiées (Yang et al. 2012). Des analogues de ces molécules sont utilisés dans la formulation d'insecticides commercialisés.

La coévolution des plantes, des parasites et des prédateurs parasitoïdes de ces ravageurs a permis la mise en place de systèmes de communication particulièrement intéressants pour les plantes. De par leurs propriétés volatiles, le (*E*)- β -farnésène et le (*E*)- α -bergamotène, deux sesquiterpènes attractifs pour les insectes parasitoïdes émis par le maïs lui permettent de se protéger contre les attaques des larves de lépidoptère (Schnee et al. 2006). Certains diterpènes ont également été étudiés pour leur implication dans la défense des plantes. Le sclaeol, molécule produite par la sauge (*Salvia sclarea*) est un composé qui semble efficace pour lutter contre la bactérie du flétrissement des Solanacées, *Ralstonia solanacearum* (Seo et al. 2012). Les graines de coton synthétisent un diterpène pigmentaire toxique, le gossypol. Ces graines sont caractérisées par une forte teneur en protéines, mais sont peu utilisées pour alimenter le bétail à cause de la présence de ce composé. Aussi, des recherches ont été lancées pour réduire les taux de gossypol dans les graines de coton; mais suite à ces recherches il a été montré que les plants produisant de plus faibles taux de cette molécule sont également très sensibles aux attaques d'insectes. Ceci prouve l'action insecticide ou répulsive de la molécule (Scheffler et Romano 2008).

2.6.2.2 Voie de biosynthèse des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes

La voie de biosynthèse des monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes dérive, comme celle des triterpènes, de l'isopentenyl diphosphate (IPP) et du diméthyllalyl diphosphate (DMAPP). Si ces deux molécules sont associées, elles forment le géranyl diphosphate (GPP), si deux IPP sont associés à un DMAPP, la molécule obtenue est un farnesyl diphosphate (FPP) et enfin, si trois IPP sont associés à

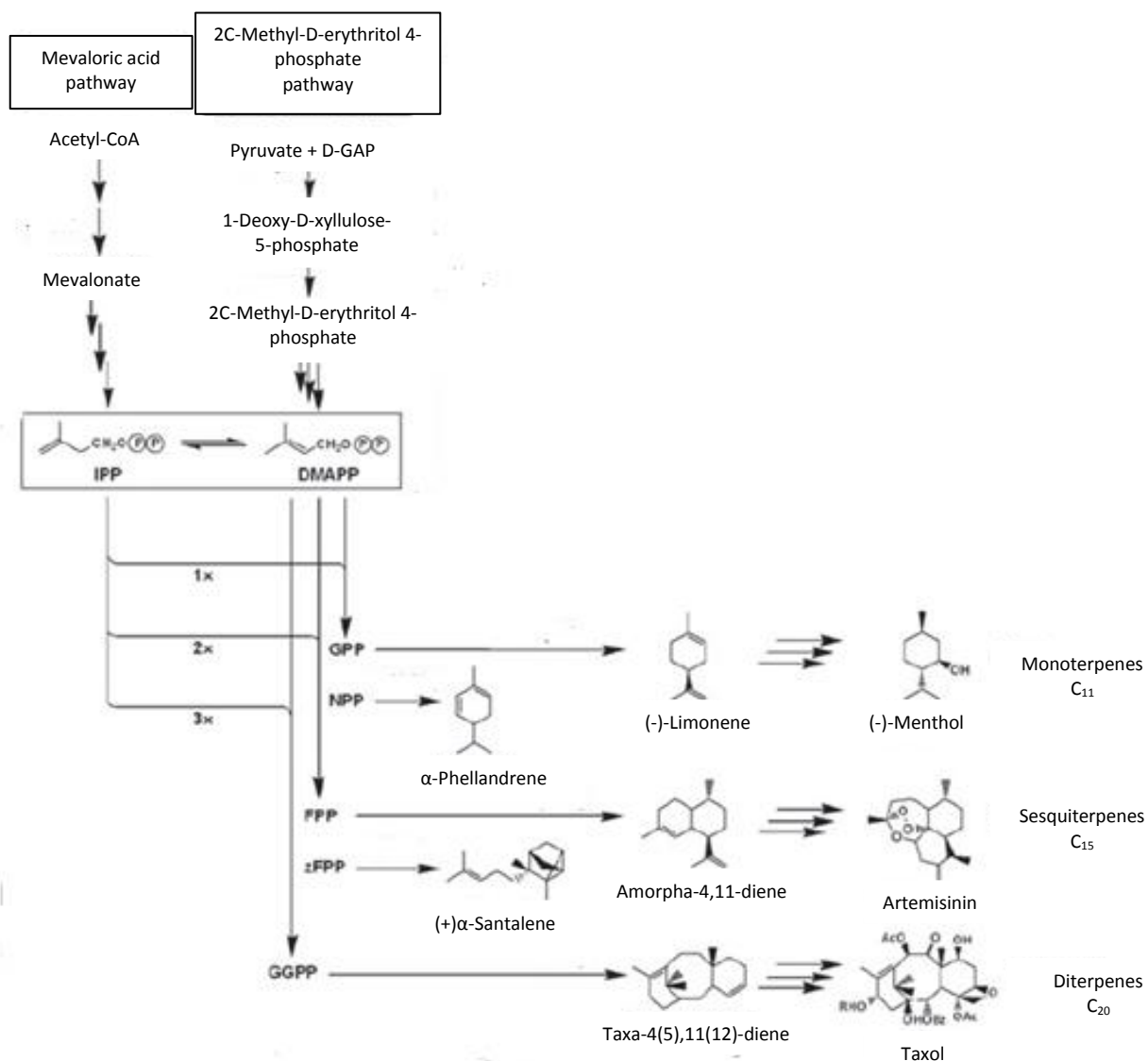


Figure 22: Voie de biosynthèse des mono-, sesqui- et diterpènes (Lange et Ahkami 2013).
 IPP: isopentenyl diphosphate; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; GPP: geranyl diphosphate; NPP: neryl diphosphate; FPP: farnesyl diphosphate; GGPP: geranylgeranyl diphosphate

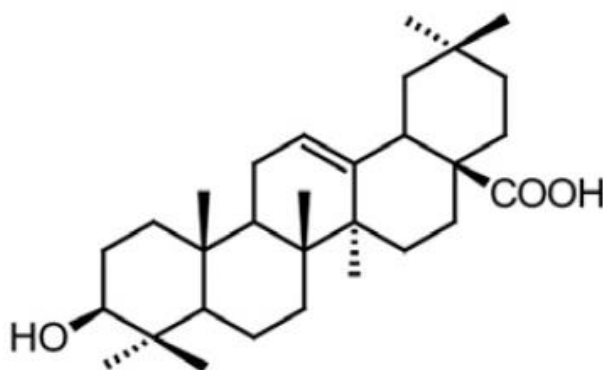


Figure 23 : Structure de l'acide oléanolique

un DMAPP, la molécule formée est un geranylgeranyl diphosphate (GGPP); ces réactions sont catalysées par des prényltransférases. Le GPP cyclisé permet d'aboutir à des molécules de la famille des monoterpènes, la cyclisation du FPP entraîne la formation de sesquiterpènes et enfin les diterpènes sont issus de la cyclisation du GGPP. Ces réactions sont catalysées par des terpènes synthases (**Figure 22**) (Lange et Ahkami 2013).

2.6.3 Métabolisme des triterpénoïdes

2.6.3.1 Rôle des triterpénoïdes dans la défense des plantes

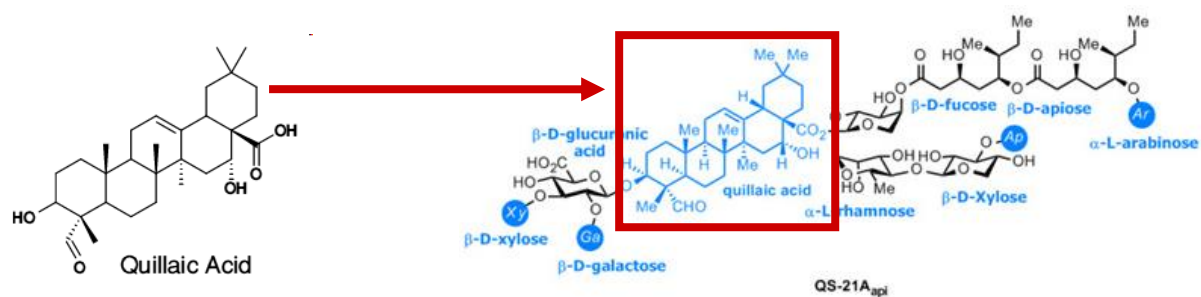
2.6.3.1.1 Triterpénoïdes libres

Les triterpénoïdes sont des molécules d'une grande diversité structurale largement répandues chez les plantes (Sawai et Saito 2011). Les triterpénoïdes proviennent tous d'un triterpène de base, molécule en C-30, qui a été modifiée sous l'action d'enzymes. Ils peuvent être accumulés dans les plantes en tant que conjugués à des carbohydrates, à des alcaloïdes et d'autres macromolécules (Chappell 2002). L'acide oléanolique par exemple, est un triterpène typique retrouvé chez de nombreuses plantes. Il existe à l'état naturel sous forme libre (**Figure 23**) ou bien en conjugaison avec des sucres (saponines) et a été particulièrement étudié pour ses caractéristiques anti-inflammatoires, antioxydant et anticancéreux (Pollier et Goossens 2012). La production d'acide oléanolique a également un intérêt pour les plantes, puisqu'il est également connu pour ses propriétés antifongiques (Becker et al. 2005) et insecticides ou répulsives (Mallavadhani et al. 2003).

D'autres triterpénoïdes comme les limonoïdes, retrouvés principalement chez les agrumes, sont connus pour leur capacité à inhiber la croissance de *B. cinerea* (Abdelgaleil et al. 2005). La bétuline est un triterpène à activité insecticide, notamment contre les larves de papillons ravageurs du maïs (Lugemwa et al. 1990). La surexpression d'une dammarenediol-II synthase a également montré que l'augmentation des teneurs en dammarenediol-II permettait d'augmenter la résistance du tabac au virus de la mosaïque du tabac (Lee et al. 2012).

Les triterpènes peuvent aussi avoir une action positive dans le cas d'une interaction plante/microorganisme symbiotique, notamment l'amélioration de la nodulation. C'est le cas de la β -amyrine chez *Medicago truncatula* ou du dihydrolupéol, composé nouvellement identifié chez *Lotus japonicus* (Confalonieri et al. 2009; Krokida et al. 2013).

(1)



(2)

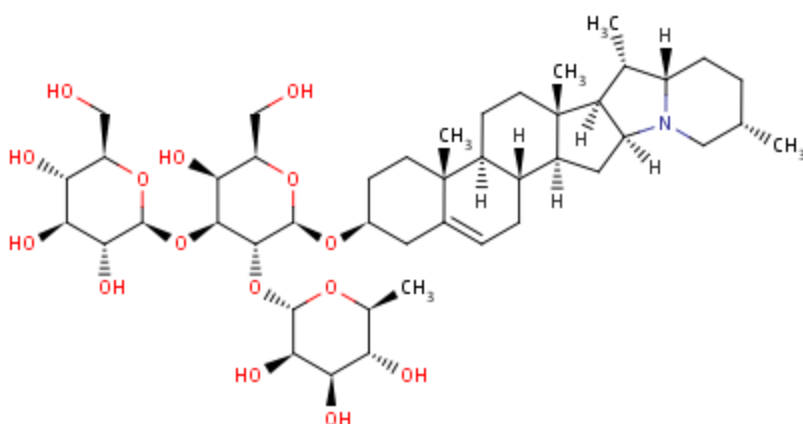


Figure 24 : Structure de deux saponines. (1) Structure d'une saponine triterpénique QS-21 issue de *Quillaja saponaria* dont la sapogénine est l'acide quillaïque. (2) Structure d'une saponine stéroïdienne, la solanine issue de *Solanum lycopersicum*

2.6.3.1.2 Triterpénoïdes glycosylés: les saponines

Les saponines sont des glycosides de triterpènes, stéroïdes ou alcaloïdes stéroïdiens (Hostettmann et Martson 1995) qui sont préformés et stockés dans les cellules de certaines plantes (Goodwin et Pollock 1954; Osbourn et al. 1994; VanEtten et al. 1994). Ces composés secondaires sont hydroxylés, puis glycosylés, ce qui les transforme en une association de sapogénine, composé aglycone, et de sucres (**Figure 24**). Les saponines triterpéniques (dont la génine est un triterpène) sont essentiellement trouvées chez les dicotylédones, tandis que les saponines stéroïdiennes (dont la génine est un stérol) sont plutôt caractéristiques des monocotylédones (Armah et al. 1999; Osbourn 1996).

L'unité de base des saponines triterpéniques est l'isoprène (six carbones) dont une combinaison à 5 cycles constitue l'essentiel des saponines des végétaux. Les oses constitutifs des saponines sont : D-glucose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique. La molécule est généralement composée d'une génine et de trois à cinq oses, mais il est possible d'en trouver jusqu'à 11. Les oses ou les oligosides sont liés à la génine par une liaison de type éther ou ester. Selon que la molécule possède un ou deux chaînons saccharidiques, s'agit alors d'un mono- ou bidesmoside (Bruneton 1999). Les saponines sont également remarquables par leur grande diversité ; outre la diversité des oses associés dans la molécule, les génines triterpéniques et stéroïdiques ont un nombre différent de substituants : -H, -COOH, -CH₃. Ainsi, le nombre de constituants, les variations dans la composition des chaînes osidiques, et la diversité de liaisons confèrent une diversité importante à la structure des saponines. Au sein d'une même espèce, différents organes peuvent contenir des saponines aux structures différentes (Oleszek et Bialy 2006). Parmi les producteurs de saponines, l'arbre *Quillaja saponaria* est une source particulièrement riche. Jusqu'à aujourd'hui, environ 80 saponines différentes ont été identifiées dans des extraits d'écorce de cet arbre (Kensil et al. 1998; Guo et Kenne 2000).

Les saponines sont des composés préformés dans les plantes et sont donc considérées comme des phytoanticipines, elles sont stockées dans les cellules, et particulièrement dans les vacuoles (Kesselmeier et Urban 1983). Cependant, l'activation des saponines par la plante peut être régulée par des facteurs biotiques, comme des herbivores, des agents pathogènes ou symbiotiques (Szakiel et al. 2011). Par exemple, chez la luzerne, les plantes attaquées par les larves de l'insecte ravageur *Spodoptera littoralis* subissent une augmentation de la libération de saponines. De plus, les larves évitent de se nourrir sur les plantes attaquées depuis plus de 5 jours, ce qui indique que les concentrations en saponines atteignent un pic après une semaine (Agrell et al. 2004; Agrell et al. 2003). Un exemple montrant l'effet contraire a été étudié chez le couple *Medicago truncatula*/

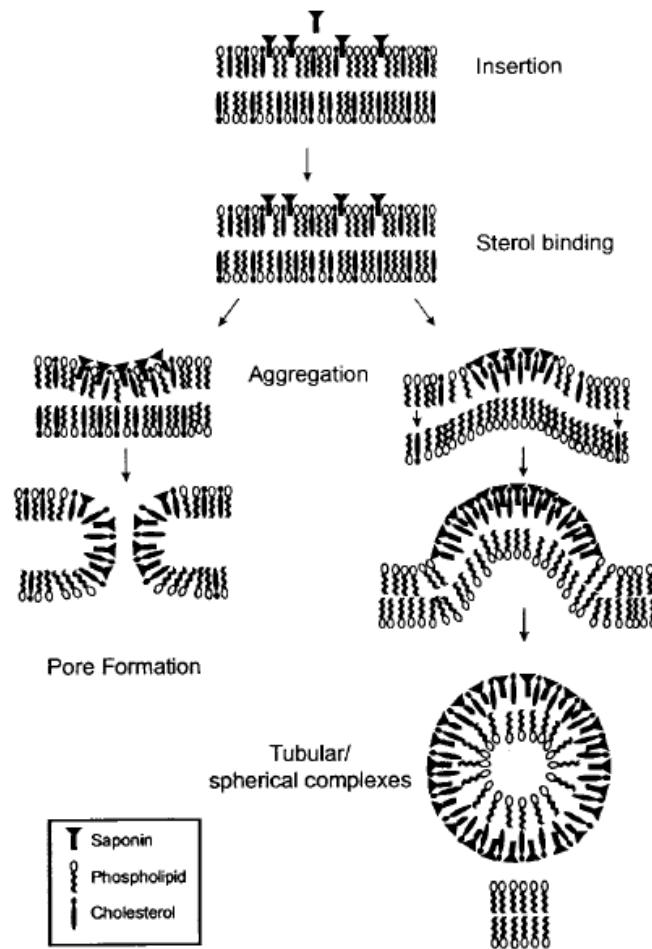


Figure 25 : Action des saponines sur la membrane plasmique (Morrissey et Osbourn 1999)

Spodoptera exigua pour lequel l'expression des gènes codant pour les étapes précoces de la synthèse des triterpènes est réduite lorsque l'insecte est présent sur la plante. Il semble ici que des facteurs salivaires soient capables d'inhiber les mécanismes de synthèse des terpènes (Bede et al. 2006). Peu d'études ont été réalisées sur l'effet des variations environnementales sur la production de saponines, les facteurs abiotiques pouvant influencer cette production sont par exemple la géographie, la saison, l'âge des plantes, la température, la conduite de culture (Szakiel et al. 2011). Chez la luzerne, les observations notables sont l'augmentation du contenu en saponines des plantes avec l'âge et de façon moins importante avec la température. Ainsi, il est par exemple recommandé de ne pas nourrir les animaux d'élevage avec de la luzerne âgée et récoltée à la fin de l'été (Pecetti et al. 2006).

Les saponines sont reconnues pour leur action sur les membranes plasmiques. De par leurs propriétés lipophiles, les saponines peuvent s'insérer dans les membranes et ainsi se lier aux stérols. Les saponines possédant une ou plusieurs extrémités hydrophiles, elles tendent à s'agréger. La formation de complexes de stérols et de saponines mène à la formation de pores (**Figure 25**) dans la membrane plasmique (Armah et al. 1999; Bangham et al. 1962; Morrissey et Osbourn 1999).

La présence de saponines à des taux élevés dans des plantes saines révèle que le contenu en saponines des plantes détermine leur capacité à se protéger contre des agents pathogènes (Morrissey et Osbourn 1999). En effet, les saponines sont capables d'affecter des animaux, des bactéries, des nématodes, des champignons et des virus (Francis et al. 2002). Plusieurs études, en particulier certaines réalisées chez l'avoine, montrent l'importance des saponines dans les interactions plantes-bioagresseurs. L'agent pathogène racinaire *Gaeumannomyces graminis* a été utilisé pour inoculer différentes espèces d'avoine connues pour leur production différentielle de saponines nommées avénacines au niveau des racines. La plus grande sensibilité des espèces déficientes en saponines montre que la présence d'avénacine est déterminante dans la résistance de l'avoine face à l'agent pathogène *Gaeumannomyces graminis* (Mert-Türk 2006; Osbourn et al. 1994; Osbourn 1996). La mutagenèse à l'azide de sodium chez l'avoine a permis d'obtenir des lignées mutantes dont la synthèse de β -amyrine, constituant la génine, est affectée (mutants *sad1*). Les mutants générés étaient tous clairement plus sensibles à l'infection fongique que les types sauvages. Les mutants ayant subi une réduction partielle de leur contenu en avénacine exprimaient un niveau de résistance intermédiaire (Papadopoulou et al. 1999; Qin et al. 2010; Trojanowska et al. 2001). Ces travaux confirment le caractère déterminant de la présence d'avénacine dans la résistance à un agent pathogène fongique. Chez *Medicago truncatula*, de forts taux de saponines sont corrélés à une résistance aux pucerons, mais pas à d'autres insectes (Sylwia, Leszczynski, et Wieslaw 2006). Il semble donc que tous les agents pathogènes ne soient pas uniformément sensibles aux saponines.

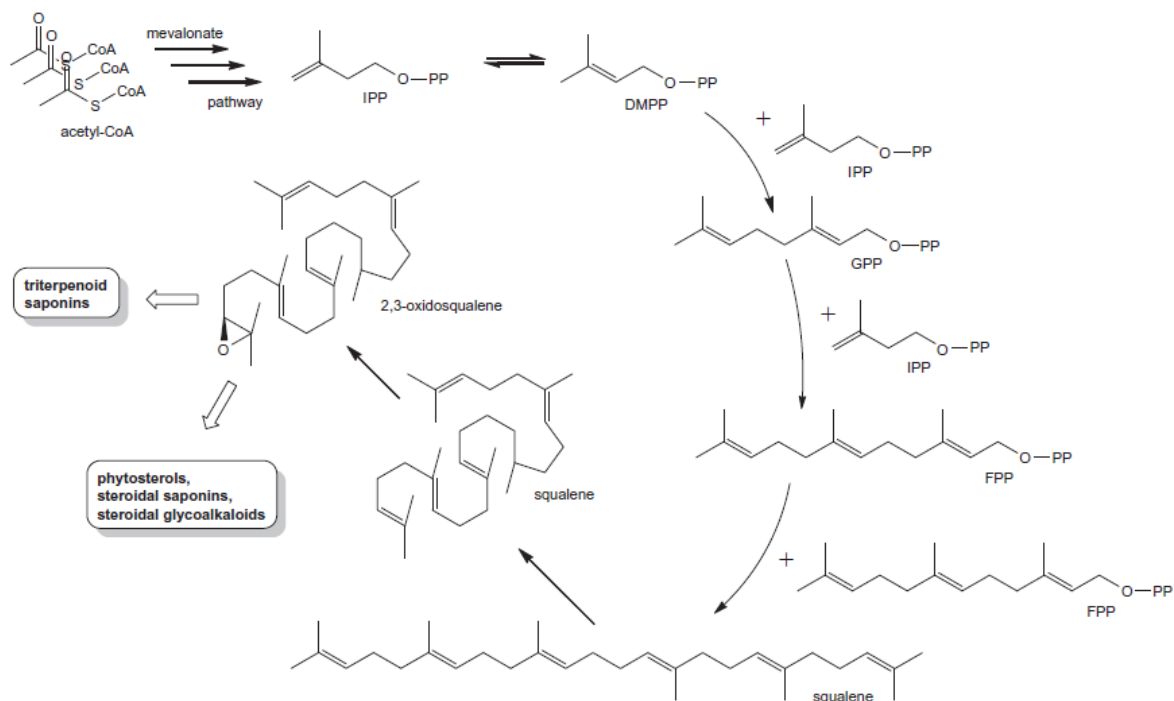


Figure 26 : Voie de biosynthèse du squalène et du 2,3-oxidosqualène (Augustin et al. 2011)

2.6.3.1.3 Résistance des agents pathogènes aux saponines

Les champignons qui infectent les plantes contenant des saponines sont plus souvent tolérants que totalement résistants à ces saponines. Certains agents pathogènes ont évolué pour pouvoir contourner la toxicité de ces composés. Certains de ces parasites ont une membrane pariétale à faible taux de stérols qui leur permet de limiter la toxicité des saponines (Arneson et Durbin 1968; Senegupta, Prasanna, et Kasbekar 1995). D'autres se développent dans les espaces intercellulaires afin de ne pas être en contact avec les compartiments cellulaires, de type vacuoles, contenant les saponines. Quelques champignons pathogènes possèdent des enzymes qui détoxifient les saponines en hydrolysant leur chaîne de sucres et mènent à la perte de leur activité biologique. Les principaux champignons phytopathogènes chez qui la présence de saponinase a été détectée sont: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *Septoria lycopersici* (Bowyer et al. 1995; Wubben et al. 1996; Carter et al. 1999; Morrissey et al. 2000). Chez *Fusarium oxysporum*, l'étude de mutants knockout a permis de montrer que la tomatinase est essentielle pour la virulence totale sur plants de tomates (Pareja-Jaime et al. 2008). Le mode de fonctionnement exact de l'action de la tomatinase produite par *S. lycopersici* a été étudié; il semblerait qu'outre une activité de détoxification des saponines présentes dans la plante, les produits de dégradation des saponines générés par cette enzyme soient capables de supprimer l'induction des défenses de la plante en interférant avec les signaux de transduction fondamentaux pour la mise en place de ces défenses (Bouarab et al. 2002). *Gaeumannomyces graminis* ainsi que *Septoria avenae* sont des champignons pathogènes de l'avoine et produisent chacun des avénacinases capables de détoxifier différentes avénacines produites par l'avoine, cette synthèse de saponinase est essentielle pour que ces espèces soient capables de coloniser cette plante (Wubben et al. 1996; Bowyer et al. 1995).

2.6.3.2 Voies de biosynthèse des triterpénoïdes

La synthèse des saponines repose sur trois étapes indispensables : la cyclisation, l'oxydation et la glycosylation de la molécule initiale. La voie de biosynthèse des saponines triterpéniques étant partagée dans ses premières étapes avec celle des stérols, ce sont les oxydations et les glycosylations qui leur ont permis d'être de plus en plus solubles dans l'eau et d'être donc évincées des membranes plasmiques, contrairement aux stérols (Henry 2011). Tous les triterpènes dérivent de la condensation de deux molécules à 5 carbones (**Figure 26**) : l'isopentenyl diphosphate (IPP) et le diméthyllalyl diphosphate (DMAPP). La biosynthèse des triterpènes est très compartimentée et les triterpènes tels que les stéroïdes et les saponines sont principalement synthétisés dans le cytosol via la voie IPP issue du mévalonate (Chappell 2002; Trojanowska et al. 2000). L'IPP et le DMAPP sont condensés en geranyl diphosphate (GPP), auquel est ajouté un nouvel IPP. La nouvelle molécule formée est le

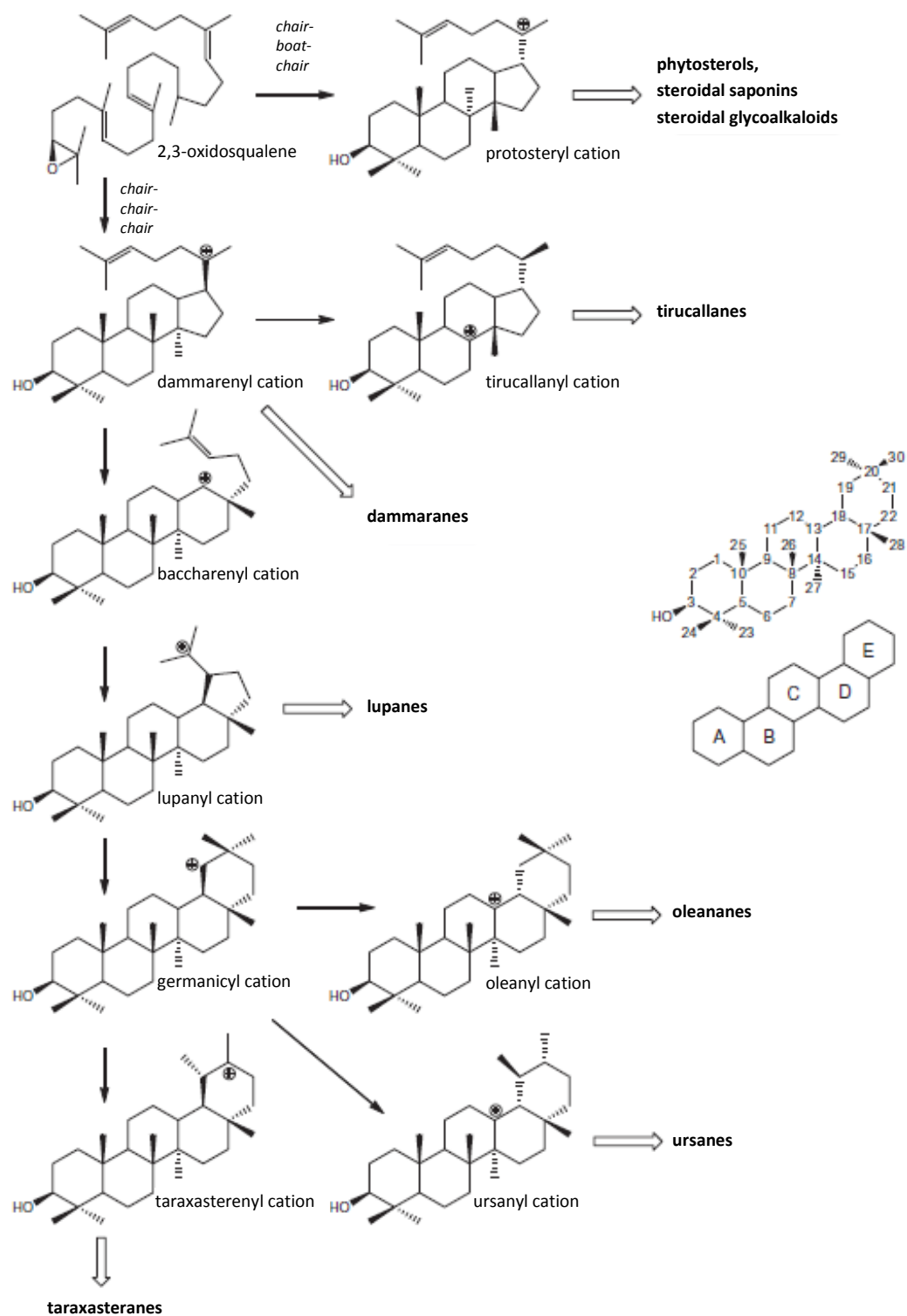


Figure 27 : Cascade de cyclisation du 2,3-oxidosqualene et triterpènes résultant de ces cyclisations.
(Augustin et al. 2011)

farnesyl diphosphate (FPP), précurseur commun d'une large gamme de sesquiterpènes produits par les plantes. La combinaison de deux FPP mène à la formation du squalène (C30) qui est ensuite oxydé en 2,3-oxidosqualène, molécule considérée comme le dernier précurseur commun des saponines triterpéniques, des phytostérols et des saponines stéroïdiennes.

La première étape impliquée dans la biosynthèse des triterpènes et des phytostérols est la cyclisation du 2,3-oxidosqualène, catalysée par des enzymes nommées oxidosqualène cyclases (OSCs). Leur action dépend de trois critères (Augustin et al. 2011) :

- la protonation du 2,3-oxidosqualène par un acide catalytique (initiation de la cyclisation)
- la présence d'une cavité catalytique qui guide la cyclisation de l'oxidosqualène
- la protection des produits intermédiaires durant la cyclisation pour empêcher d'autres réactions

Le grand nombre de possibilités de liaisons internes survenant lors de la cyclisation conduit à une grande variabilité de structures. Plus de 100 structures de triterpènes différentes ont été trouvées dans la nature et proviennent de l'activité de diverses OSCs (Xu et al. 2004).

Cependant, la principale caractéristique de la cascade de cyclisations catalysée par les OSCs à l'origine des triterpènes pentacycliques est la conformation chaise-chaise-chaise contrairement à la conformation chaise-bateau-chaise catalysée par les OSCs stéroïdiennes (**Figure 27**). Le premier intermédiaire de la synthèse des triterpènes est le cation dammarenyl. Ce dernier, lorsqu'il est déprotoné est à l'origine des triterpènes de type dammarane (Augustin et al. 2011). Si ce n'est pas le cas, d'autres réarrangements mènent à une molécule à l'origine des triterpènes de type tirucallane ou menant au cation baccharenyl. La transformation de ce cation mène au cation pentacyclique lupanyl à l'origine des triterpènes de type lupane. La réouverture du cycle à 5 carbones du lupanyl et son expansion en un cycle à 6 carbones le transforme en cation germanicyl (**Figure 27**), transformé ensuite en cation oleanyl (triterpènes de type oleanane), en cation taraxasterenyl (triterpènes de type taraxasterane) ou en cation ursanyl (triterpènes de type ursane) (Augustin et al. 2011).

Les OSCs qui nous ont particulièrement intéressés sont celles qui synthétisent des triterpènes à partir du cation dammarenyl. Certaines OSCs génèrent un triterpène unique. Parmi celles-ci on peut distinguer des lupéol synthases identifiées chez *Glycyrrhiza glabra*, *Betula platyphylla*, *Taraxacum officinale* et *Olea europea* (Phillips et al, 2006). Des β -amyrine synthases ont également été caractérisées chez plusieurs monocotylédones et dicotylédones (Phillips et al. 2006). Il existe aussi des OSCs multifonctionnelles capables de synthétiser des produits multiples. Par exemple, *Arabidopsis* produit des OSCs synthétisant plusieurs produits, dont LUP1 synthétisant majoritairement le lupéol et le 3 β -20-dihydroxylupéol, et LUP2 synthétisant majoritairement la β -

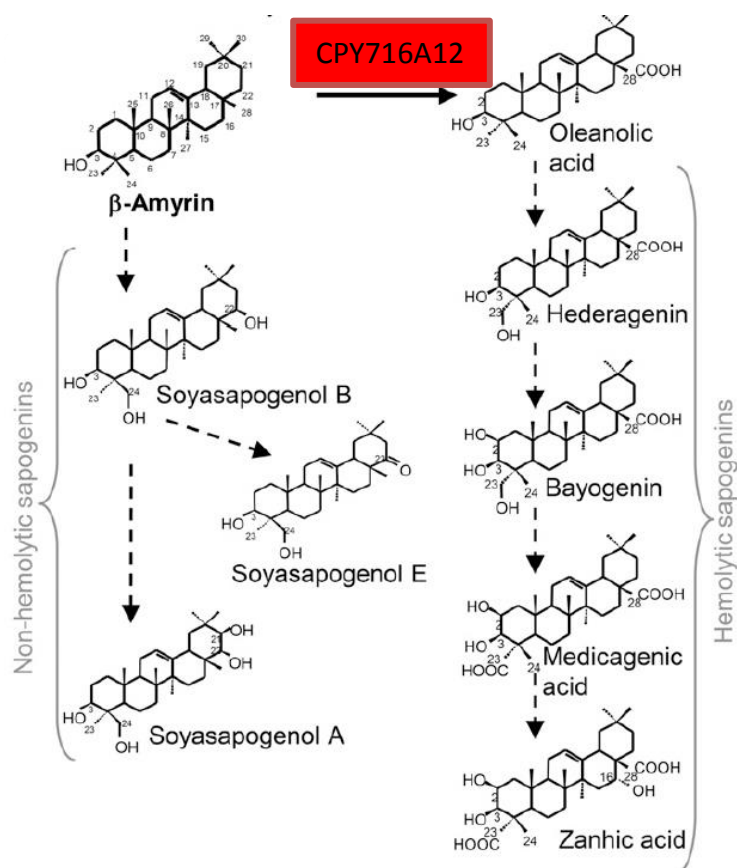


Figure 28 : Rôle clé du gène codant pour le cytochrome P450 (CPY716A12) dans la spécificité de la synthèse des saponines (Carelli et al. 2011)

amyrine et le lupéol. Ces OSCs multifonctionnelles ont également été retrouvées chez les Légumineuses (Phillips et al. 2006). Il a été montré que le profil des produits synthétisés par les OSCs stéroïdiennes reflète leur position phylogénétique, ce n'est cependant pas le cas des OSCs utilisant le cation dammarényl qui ont tendance à se grouper en fonction de leur appartenance à un groupe de plantes plutôt qu'en fonction de leur spécificité de substrat (Phillips et al. 2006). De plus, certaines OSCs sont capables de synthétiser plusieurs composés, il semble donc peu évident de prédire la fonction d'une OSC à partir de sa position sur un arbre phylogénétique (Segura et al. 2000).

Après la formation de la structure triterpénique, la synthèse des saponines nécessite une transformation de cette dernière en aglycone hydrophobe appelé sapogénine. Le type et l'étendue des modifications subies par le triterpène varient selon la plante qui les produit (Vincken et al. 2007). Les modifications de la sapogénine contribuent donc considérablement à la variabilité de la structure des saponines. Les modifications les plus communes sont liées à de petits groupes fonctionnels de type hydroxyle-, keto-, aldéhyde- et carboxyle- à différentes positions sur le squelette triterpénique. La plupart des modifications permettant la formation des sapogénines sont liées à l'action d'enzymes appartenant à la classe des cytochromes P450, hémoprotéines caractérisées par leur capacité à catalyser des attaques oxydatives en transférant un atome d'oxygène sur des hydrocarbures non activés (Werck-Reichhart et Feyereisen 2000). Les P450 appartiennent à des familles multigéniques et sont un facteur clé de l'immense diversité structurale des saponines. Chez *A. thaliana*, 246 P450 ont été dénombrées à ce jour (Werck-Reichhart et al. 2002). Une famille de P450 nommée CYP a été particulièrement étudiée pour son implication dans la synthèse de saponines, ces enzymes ont une action qui varie non seulement en fonction de squelette général du substrat triterpénique, mais également en fonction de la zone ciblée de la réaction (Sawai et Saito 2011). Par exemple, chez *Medicago truncatula*, la CYP716A12 catalyse l'oxydation de la β -amyrine en position C-28 (**Figure 28**), ce qui permet la formation de l'acide oléanolique (Fukushima et al. 2011). Une mutation au niveau de ce gène entraîne la formation de saponines très différentes, puisque les saponines dérivant de l'acide oléanolique ont en général une activité hémolytique tandis que les saponines dérivant de la β -amyrine ne l'ont pas (Carelli et al. 2011). L'activité d'enzymes appartenant à la famille des P450 est soumise à des mécanismes complexes de l'évolution. Par exemple, il a été montré que la duplication, puis la divergence d'une P450 impliquée dans la synthèse de stérols a abouti à l'apparition d'une enzyme impliquée dans la synthèse de l'avénacine, suggérant une coévolution des voies de biosynthèse des stérols et des saponines (Qi et al. 2006).

L'apport de chaînes osidiques à la sapogénine est l'étape qui suit en général les modifications catalysées par les P450. La glycosylation caractéristique des saponines est l'apport d'oligomères osidiques de 2 à 5 oses liés aux positions C3 et/ou C28 du squelette triterpénique. La glycosylation

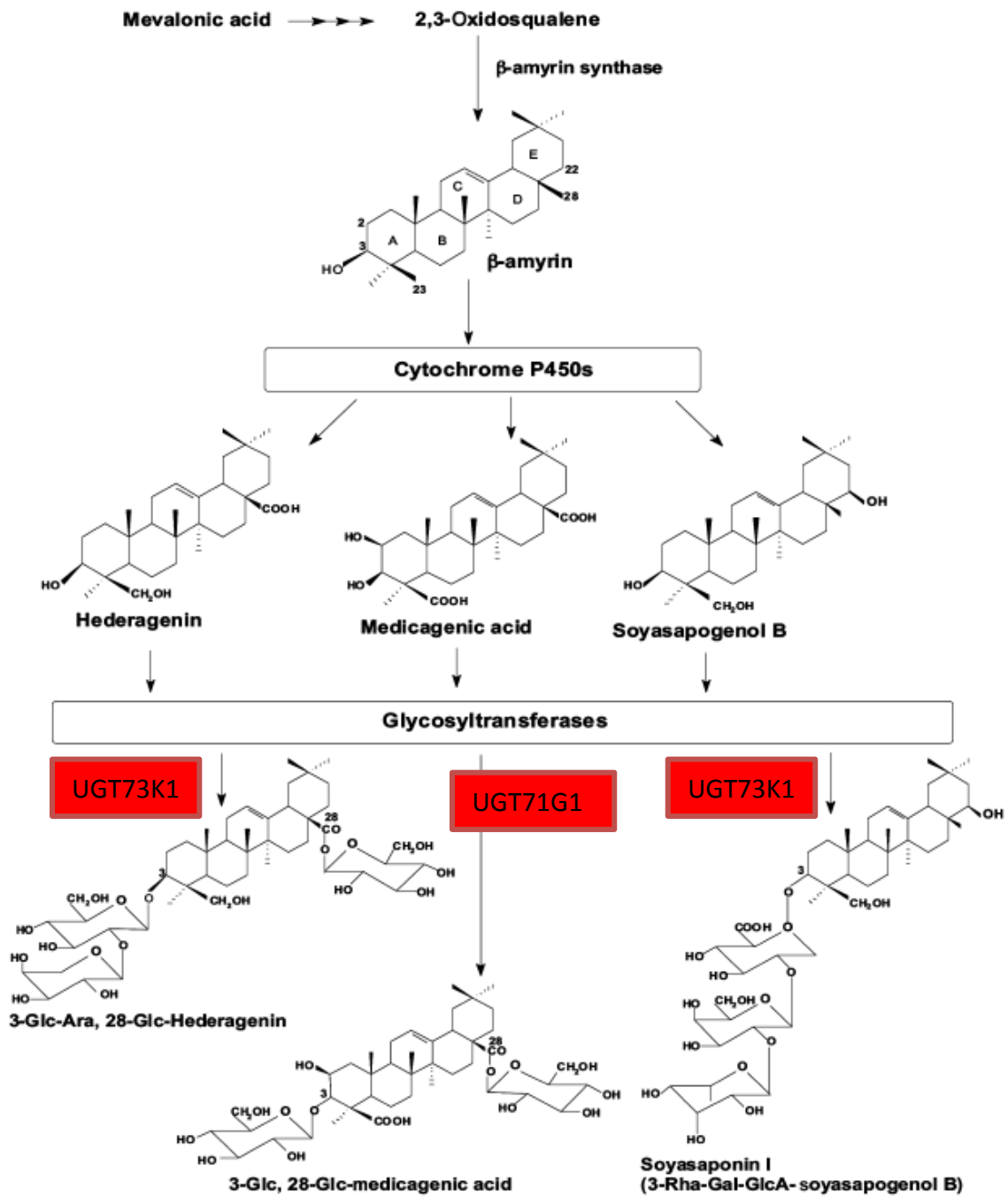


Figure 29 : Modifications subies par la β -amyrine pour être transformée en saponines chez *Medicago truncatula*: oxydations/hydroxylations et glycosylations (Achnine et al. 2005)

UGT : Uridine diphosphate glycosyltransférase

des saponines implique l'activité de différentes enzymes appartenant à la famille multigénique des uridine diphosphate glycosyltransférases (UGTs) qui catalysent le transfert de sucres activés par l'uridine diphosphate vers une vaste gamme de molécules réceptrices. La glycosylation des métabolites et des molécules exogènes permet en général de contrôler leur stabilité, leur solubilité, leur activité biologique et sert de signalisation pour le stockage inter- et intracellulaire (Vogt et Jones 2000). Chez *A. thaliana*, 115 UGTs ont été identifiées à ce jour (Yonekura-Sakakibara et Hanada 2011). La fonction de certaines UGTs a été caractérisée et a montré que ces enzymes agissent par spécificité de structure plus que par spécificité de substrat. Par exemple, l'UGT73K1 issue de *M. truncatula* permet de glycosyler *in vitro* l'hédéragénine et les soyasapogénols B et E, tandis que l'UGT71G1 est capable de glycosyler l'acide médicagénique, mais également certaines isoflavones (**Figure 29**) (Achnine et al. 2005).

La synthèse des saponines est donc une suite complexe de réactions mettant en jeu de nombreuses enzymes et menant à une diversité très importante de la structure des saponines.

3. Vers l'utilisation de moyens de lutte respectueux de l'applicateur et de l'environnement

3.1 Prédominance de la viticulture conventionnelle au XXe siècle : état des lieux

La civilisation humaine a, depuis plusieurs milliers d'années, été liée à la vigne et à sa domestication. Depuis les années 1850, l'augmentation des échanges mondiaux a entraîné la dispersion des maladies et l'apparition de certains agents pathogènes dans des régions qui en étaient épargnées. L'arrivée de l'oïdium, du mildiou et du phylloxéra a plongé le monde viticole européen dans des crises sanitaires majeures. La phytopharmacie a été introduite au début du XIXe siècle avec les sels de cuivre notamment. Au cours du XXe siècle, l'amélioration des connaissances en chimie a permis l'apparition des premiers fongicides systémiques.

A partir de ces années, les viticulteurs ont utilisé massivement des molécules de synthèse qui ont permis de régler les problèmes de maladies et de rendement. Cette agriculture est aujourd'hui nommée l'agriculture conventionnelle. Elle est caractérisée par l'utilisation de différents pesticides : systémiques, pénétrants ou de contact. Les produits systémiques pénètrent dans les tissus de la plante et s'y déplacent en exerçant leur action à des endroits éloignés de leur lieu d'application, les produits pénétrants ne peuvent par contre pas se déplacer une fois dans les tissus. Les produits de contact restent quant à eux à la surface des plantes (Blouin 2007). Les produits systémiques ou pénétrants peuvent être accumulés dans les plantes, ce qui limite les problèmes de lessivage. Ils sont à la fois préventifs et curatifs, cependant leur action est généralement spécifique et leur utilisation trop importante peut entraîner des apparitions de résistances chez les bioagresseurs ciblés. La viticulture conventionnelle est également associée à des applications de traitements non raisonnées, survenant à des dates déterminées et non en lien avec les observations faites au vignoble.

L'intensification des cultures, la sélection des plantes ayant pour unique critère le rendement, la gestion temporelle des résistances et le manque de diversité génétique des espèces cultivées sont autant de facteurs qui sont responsables de l'augmentation des pressions parasitaires. Le siècle dernier a donc été marqué par la sur-utilisation de produits phytosanitaires issus de la chimie de synthèse. Cependant, bien que les phénomènes de famine aient été limités dans les pays ayant recours à ces méthodes, le niveau des pertes dues aux ravageurs a augmenté dans le monde entre les années 1965 et les années 1990 (Lewis et al. 1997).

3.2 Contexte de limitation des produits phytosanitaires

L'approche stratégique mise en place pour lutter contre les agents pathogènes des cultures doit nécessairement être raisonnée à l'échelle de l'agroécosystème et non en prenant le ravageur comme une unité à détruire (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture 2011). De plus, la découverte progressive de la toxicité des produits employés pour l'homme et pour l'environnement entraîne petit à petit le retrait de ces substances actives du marché. De nouvelles approches doivent donc être mises en place pour lutter contre les ravageurs des cultures tout en respectant le milieu dans lequel ils se développent.

Dans ce cadre et suite au Grenelle de l'environnement de 2006, le plan Ecophyto 2018 a été élaboré par le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt et prône la mise en place d'un système diminuant de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires entre 2008 et 2018.

3.3 Concepts théoriques de raisonnement des traitements en viticulture

La viticulture est un secteur fort consommateur en produits phytosanitaires. Comme précisé en introduction, avec une SAU de 3%, la viticulture consomme 20% des produits phytosanitaires. Ce secteur demande des interventions fréquentes pour garantir les qualités des récoltes, de l'ordre de 8 à 15 passages par campagne. La Mutualité Sociale Agricole a réalisé une étude en 1997 sur les incidents liés à l'utilisation professionnelle des pesticides et a montré que 22% des déclarations d'incidents étaient liées à la viticulture. En ce qui concerne les risques pour les consommateurs, les analyses réalisées par la direction générale de l'alimentation du ministère de l'agriculture (2005) montrent que les délais d'emploi avant récolte et de nombre maximal d'applications sont respectés car seulement 0,5% de dépassement de la limite maximale de résidus (LMR) ont été détectés sur raisins et aucun dépassement de LMR n'a été noté dans les vins analysés entre 1990 et 2003. Les analyses de résidus de produits phytosanitaires dans les bassins versants viticoles ont montré que de nombreux herbicides et fongicides sont retrouvés dans les eaux superficielles et souterraines (Direction générale de l'alimentation 2005). Ces composés représentent un risque pour l'environnement terrestre et aquatique des parcelles.

Il semble donc important de raisonner l'utilisation de ces pesticides, dont une part se retrouve donc déviée de sa cible initiale, afin de limiter les risques pour l'environnement.

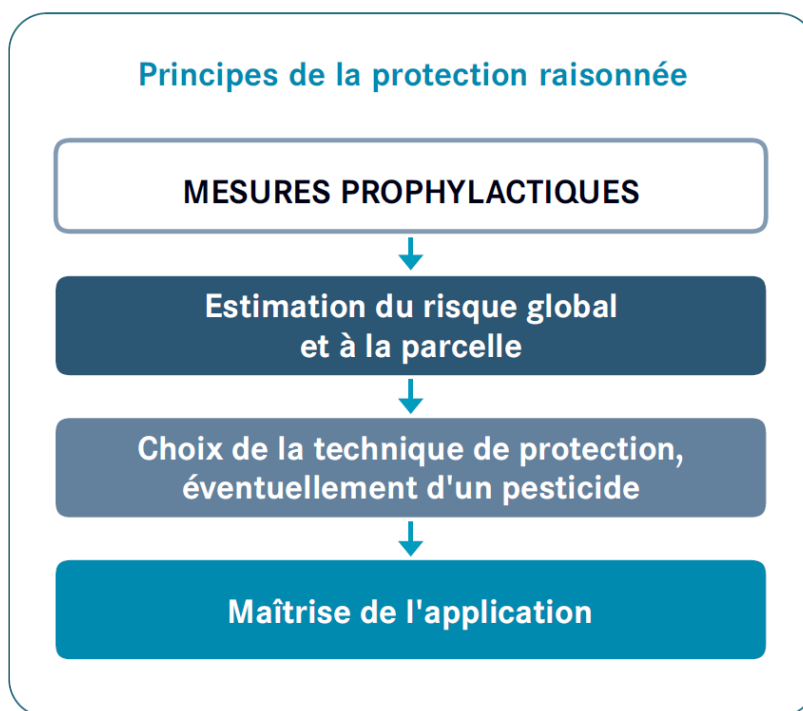


Figure 30 : Principes de la protection raisonnée (Direction générale de l'alimentation 2005)

Ces dernières années, différents concepts de raisonnement des traitements ont été développés, ils sont alternatifs à la lutte dite « classique ». Les termes de protection intégrée, viticulture raisonnée, viticulture biologique et viticulture biodynamique sont définis ci-après.

La protection intégrée en viticulture définie au paragraphe 6 de l'article 3 de la Directive 2009/128/CE, repose sur la prophylaxie et donc la désinfection du matériel ainsi que la plantation de végétaux certifiés, c'est le premier moyen d'éviter l'installation des maladies. La stratégie de lutte doit être basée sur l'estimation du risque en tenant compte des caractéristiques de la parcelle, du stade de sensibilité de la vigne, des informations fournies par les Avertissements Agricoles et des prévisions météorologiques. Si l'étude de ces critères pousse à utiliser une technique de protection des parcelles, la pratique de la protection intégrée nécessite de donner la priorité aux techniques de lutte alternatives aux pesticides tant qu'elles sont efficaces.

La viticulture raisonnée est l'application à la viticulture du concept d'agriculture raisonnée (**Figure 30**). Elle est définie de la façon suivante dans le décret de la qualification des exploitations au titre de l'agriculture raisonnée n° 2002-631 du 25 avril 2002: *« L'agriculture raisonnée correspond à des démarches globales de gestion d'exploitation qui visent, au-delà du respect de la réglementation, à renforcer les impacts positifs des pratiques agricoles sur l'environnement et à en réduire les effets négatifs, sans remettre en cause la rentabilité économique des exploitations. Les modes de production raisonnée en agriculture consistent en la mise en œuvre de moyens techniques dans une approche globale de l'exploitation. Au-delà des impératifs de la sécurité alimentaire des produits agricoles, qui s'imposent à toutes les productions, les modes de production raisonnée peuvent faciliter la maîtrise des risques sanitaires et contribuer à l'amélioration du bien-être animal. Ils permettent également de contribuer à l'amélioration des conditions de travail ».*

Les viticulteurs en agriculture biologique doivent utiliser des produits exempts de molécules de synthèse. Les principaux traitements appliqués dans ce cadre sont le cuivre, le soufre et des insecticides d'origine végétale. Le raisonnement de cette lutte est appliqué au système dans son ensemble, puisque leur objectif est de privilégier la vie des sols, la pérennité des espèces animales et végétales en favorisant l'écosystème naturel. La culture biologique de la vigne est régie comme l'ensemble des productions végétales biologiques par le règlement européen CE 2092/911, commun à l'ensemble des pays de l'Union Européenne. La mention « agriculture biologique » est donnée sous réserve de respect d'un cahier des charges, assuré par des contrôles effectués par des organismes certificateurs agréés par l'état.

La viticulture biodynamique repose sur la recherche de l'équilibre de la vigne avec son environnement, qu'il soit immédiat ou plus lointain. Ce concept est apparu en 1924, sous l'influence

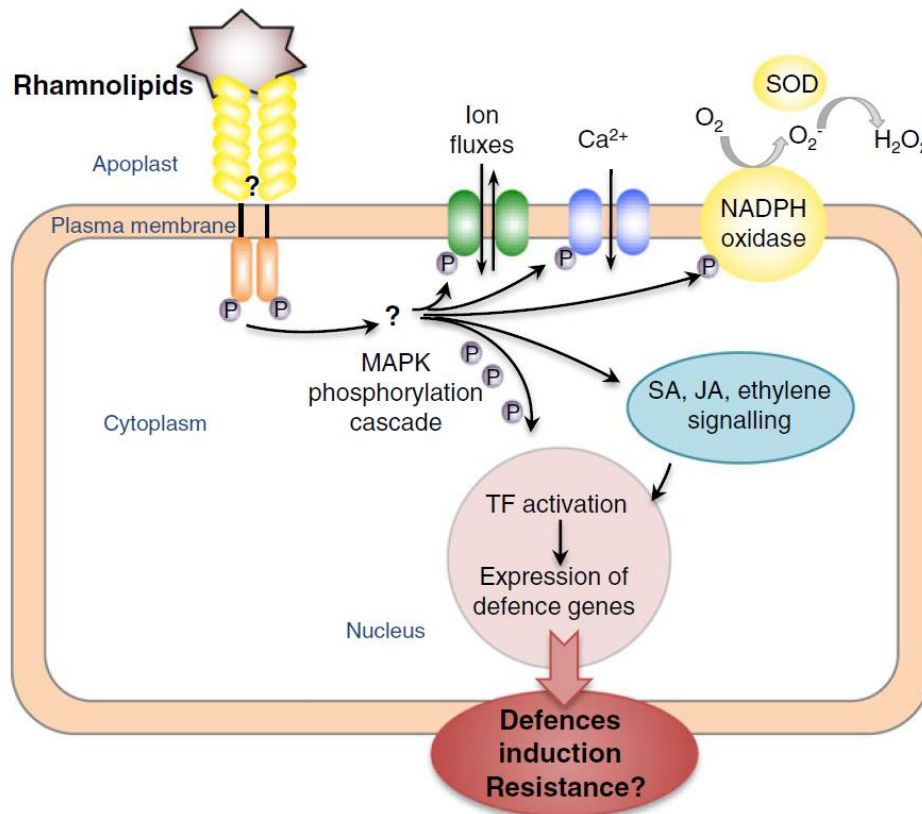


Figure 31 : Utilisation de rhamnolipides bactériens pour éliciter les réponses de défense des plantes (Delaunois et al. 2013)

TF : Transcription factor ; SOD : Superoxyde dismutase

de Rudolf Steiner, philosophe et agronome autrichien et dont les principes fondamentaux sont l'amélioration du sol et de la plante par des préparations issues de matières végétales, animales et minérales, l'application de ces préparations à des moments précis en fonction des cycles de végétation de la vigne et en rapport avec le calendrier lunaire et planétaire et le travail du sol par des labours et des griffonnages. Différents labels certifient les produits issus de l'agriculture biodynamique, il s'agit des labels Demeter et Biodyn. Ces théories, même si elles apportent de nouvelles pistes de réflexion nécessitent un appui et une vérification scientifiques.

3.4 Méthodes alternatives testées ou utilisées contre les maladies de la vigne

3.4.1 Stimulation des défenses naturelles

La définition d'un éliciteur de défense chez les plante a été posée par Klarzynski et Fritig (2001), il s'agit de substances capables de stimuler des défenses spécifiques et d'aider la plante à développer une résistance à une attaque ultérieure par un agent pathogène. L'utilisation de tels composés semble une bonne alternative aux produits phytosanitaires, puisqu'elle est basée sur des molécules qui sont principalement d'origine naturelle et qu'elle repose sur la mise en place des défenses par la plante.

Dans leur revue très complète, Delaunois et al. (2013) établissent l'état des lieux des recherches sur les éliciteurs comme moyen de lutte contre des agents pathogènes de la vigne au laboratoire et au champ. Voici une liste non exhaustive des molécules qui ont montré une action élicitrice lorsqu'elles ont été appliquées sur vigne au laboratoire.

Les rhamnolipides bactériens ont été décrits comme des éliciteurs de l'immunité non spécifique de la vigne. En effet, ils sont reconnus par la plante comme des MAMPs et stimulent donc les réponses précoces comme l'influx d'ions calcium, la production de ROS et la cascade de phosphorylation (**Figure 31**). De par leur propriété de surfactants, ils pénètrent rapidement dans les cellules et ne nécessitent donc pas de formulation pour l'application. Outre une action directe sur les spores de *B. cinerea*, les rhamnolipides permettent une meilleure protection de la vigne contre cet agent pathogène (Varnier et al. 2009) grâce à la stimulation de réponses de défense précoces.

Des éliciteurs fongiques permettent également de stimuler les défenses de la vigne. C'est le cas du chitosan, un dérivé de la chitine qui induit de façon ciblée une accumulation de phytoalexines dans les feuilles de vigne et permet à la plante de résister à une infection par *B. cinerea* et *P. viticola* (Aziz et al. 2006). L'ergostérol, composé de la membrane des champignons, est capable de stimuler

l'expression d'un gène codant pour une stilbène synthase et d'augmenter le niveau de résistance face à *B. cinerea* (Laquittaine et al. 2006).

La laminarine, un β -1-3 glucane extrait de l'algue brune *Laminaria digitata* permet de protéger les feuilles de vigne d'infections par *B. cinerea* et *P. viticola* (Aziz et al. 2003). L'application d'une laminarine sulfatée (PS3) induit, par la voie du JA, la protection de la plante face à une attaque par *P. viticola* (Trouvelot et al. 2008).

La thiamine (vitamine B1) permet également l'activation des réactions précoces de défense, induit une réaction de type HR et permet une résistance des feuilles à l'infection par *P. viticola* (Boubakri et al. 2012).

Contrairement aux tests réalisés en laboratoire, peu de tests d'efficacité d'éliciteurs ont été réalisés en plein champ. Les résultats sont bien souvent décevants, car les produits testés, bien que totalement efficaces au laboratoire montrent une efficacité partielle au vignoble. Par exemple, lors d'un criblage de produits alternatifs aux produits phytosanitaires pour lutter contre *P. viticola*, l'agent responsable du mildiou, il a été montré que les éliciteurs confèrent une résistance de l'ordre de 40 à 80% par rapport aux témoins non traités, tandis que les produits conventionnels permettent d'obtenir une résistance de l'ordre de 90 à 100% (Dagostin et al. 2011).

La protection des cultures par l'application d'éliciteurs, bien que prometteuse, nécessite de comprendre l'impact de données environnementales sur celle-ci, comme l'effet cépage, l'effet de l'âge des plants, et l'impact des stress environnementaux.

3.4.2 Lutte biologique

La définition officielle de l'Organisation Internationale de Lutte Biologique stipule que la lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs.

Certains microorganismes sont capables de neutraliser les agents pathogènes des plantes sans affecter ces dernières, cette action peut être due à une compétition pour les nutriments, la production de métabolites inhibiteurs et/ou le parasitisme (Elmer et Reglinski 2006). Cette technique de lutte a particulièrement été étudiée chez les insectes et les acariens. Dans les régions viticoles du sud de l'Australie, une étude a montré que des acariens prédateurs sont naturellement présents dans les vignobles infectés par des acariens ravageurs tels que *Brevipalpus* spp. et *Colomerus vitis*. Dans les zones fortement traitées aux fongicides, les populations prédatrices sont affectées et le

développement des acariens parasites est plus important, il est donc nécessaire de raisonner l'application des traitements afin de favoriser la prédation naturelle dans les parcelles (James et Whitney 1993).

La lutte biologique pour lutter contre les champignons pathogènes est une méthode de plus en plus étudiée. Différents microorganismes sont capables de jouer ce rôle. C'est le cas de certaines bactéries rhizosphériques comme *Pseudomonas fluorescens* et *Pantoea agglomerans* qui, lorsqu'elles sont infiltrées dans le sol au vignoble, sont capables d'augmenter la résistance des plantes face aux infections par *B. cinerea*. Il semblerait que ces bactéries stimulent les défenses de la plante et la rendent capable de se protéger de certaines attaques (Magnin-Robert et al. 2007). Certaines souches de champignons du genre *Trichoderma* sont également capables de protéger la vigne d'attaques fongiques, c'est le cas de *T. harzanum* souche T39 qui est commercialisée sous le nom de Trichodex (Makhteshim Agan, Israël) en tant que pesticide biologique pour lutter contre *B. cinerea*. Cette souche a également été montrée comme efficace en tant que prétraitement des plants contre *P. viticola*, l'incidence de la maladie étant réduite de 63% (Perazzolli et al. 2008). L'oomycète *Pythium oligandrum* permet également de protéger la vigne. L'action de cet agent est complexe, puisqu'il est capable de mycoparasitisme, il produit également des métabolites toxiques pour les agents pathogènes, et il est capable de stimuler la mise en place des défenses par la plante (Benhamou et al. 2012). *P. oligandrum* permet d'augmenter la résistance des plantes à différents agents pathogènes fongiques tels que *B. cinerea*, mais aussi au champignon *Phaeomoniella chlamydospora* impliqué dans les maladies du bois (Gerbore et al. 2011).

3.4.3 Création d'hybrides

Vitis vinifera est une espèce sensible aux agressions parasitaires. Aussi, suite aux ravages causés par certains agents pathogènes comme le phylloxéra au début du XXe siècle, les ressources génétiques de certains cépages comme les *Vitis* et *Muscadinia* d'origine asiatique et américaine ont été utilisées pour créer des porte-greffes hybrides permettant une meilleure résistance au phylloxera. Cette recherche se poursuit toujours afin d'optimiser les caractéristiques de résistance de ces porte-greffes aux phylloxéras gallicoles et radicoles (Pavloušek 2012).

Afin de lutter contre les agents pathogènes du mildiou et de l'oïdium, la création d'hybrides possédant de forts niveaux de résistance à ces deux parasites est en cours de réalisation (Equipe GAV de l'INRA de Colmar). L'utilisation de géniteurs résistants tels que *Muscadinia rotundifolia* ou *Vitis amurensis* (Blanc et al. 2012; Blasi et al. 2011) et l'introgession de leurs gènes d'intérêt dans le fond

génétique de *V. vinifera* ont permis l'obtention d'hybrides combinant les facteurs de résistance souhaités. La détermination du niveau de résistance et des aptitudes culturales et œnologiques est déterminée au vignoble et permet de sélectionner un nouveau lot d'hybrides possédant ces qualités. La dernière étape du programme est l'inscription de ces variétés obtenues au catalogue officiel français. Selon cette équipe, 10 à 20 variétés devraient être disponibles à l'horizon 2020.

En Allemagne, la variété Regent est cultivée depuis 1996 ; elle est issue du croisement entre la variété Diana (Sylvaner x Müller-Thurgau) et la variété Chambourcin (hybride interspécifique d'origine européenne et américaine). Cette variété résistante à *P. viticola* et *E. necator* permet de limiter l'application de produits phytosanitaires dans les parcelles. L'introgression de gènes de résistance chez la vigne doit néanmoins être réalisée de façon multiple et pyramidale, car l'évaluation de la résistance d'hybrides complexes issus des croisements de *Vitis rotundifolia*, *V. vinifera*, *V. berlandieri*, *V. rupestris*, *V. labrusca*, et *V. aestivalis* a montré que *E. necator* était capable de contourner les gènes de résistance assez rapidement (Ramming et al. 2012).

Dans le cas de la lutte contre le GFLV, une résistance totale au nématode *Xiphinema index* a été identifiée chez *Muscadinia rotundifolia*. Cette résistance a donc été introgressée dans des porte-greffes de variétés cultivées, le nouveau porte-greffe a été nommé Némadex Alain Bouquet. Il permet de retarder la contamination des vignes par le virus. La résistance du Némadex Alain Bouquet est intéressante mais pas totale et nécessite une amélioration de ses qualités culturales comme la résistance à la sécheresse (Bouquet et al. 2003; Esmenjaud et Bouquet 2009).

3.4.4 Transgénèse chez la vigne

La principale stratégie de transgénèse appliquée chez la vigne est la stimulation des réponses de défense. D'une part, la surexpression des éléments de signalisation, d'autre part la surexpression d'effecteurs de défense constituent des stratégies de recherche sur la transgénèse en viticulture. Les recherches sur cette méthode ont été développées pour la lutte contre les attaques fongiques par exemple. Des plants surexprimant le gène *Vst1*, codant pour une stilbène synthase sous le contrôle d'un promoteur inductible par les agents pathogènes, accumulent de plus grandes quantités de resvératrol et présentent des niveaux de résistance à une infection par *B. cinerea* supérieurs à ceux des témoins (Coutos-Thévenot et al. 2001). Deux études basées sur la surexpression de gènes impliqués dans la signalisation des réponses de défense des plantes ont permis d'obtenir des plants de vigne résistants à *E. Necator* et à *P. viticola*, c'est le cas de la surexpression de *VvNPR1* (Le Henanff

et al. 2011), élément de signalisation de la voie du SA, et du facteur de transcription WRKY1 (Marchive et al. 2013).

Pour lutter contre le virus responsable de la maladie du court-noué, la stratégie de lutte dérivée du pathogène via la voie de la transgénèse a également permis de créer des pieds de vigne qui retardent l'apparition de la maladie. Ce concept élaboré en 1985 consiste en un transfert de séquence d'origine virale dans le génome d'une plante afin de perturber le cycle de multiplication du virus et de rendre la plante résistante à ce dernier (Fuchs 2008). Des plants exprimant des séquences codant des protéines de la capsid virale ont été produits et placés dans des vignobles contaminés ou greffés en conditions contrôlées (Gambino et al. 2010; Vigne et al. 2004). Dans un essai de 3 ans au champ, quelques lignées exprimant cette protéine virale se sont montrées résistantes au GFLV (Vigne et al. 2004). Dans une autre étude, des microARNs artificiels ciblant le gène codant la protéine de la capsid virale du GFLV ont été développés et testés dans des embryons somatiques de vigne. La reconnaissance et le clivage de la cible ont été montrés *in vivo*, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour la création de plants résistants au GFLV (Jelly et al. 2012).

Une approche originale a été développée pour lutter contre *Xylella fastidiosa*, l'agent bactérien responsable de la maladie de Pierce. Une chimère protéique capable à la fois de reconnaître les éléments de surface de l'agent pathogène et de les lyser a été créée. Le transgène, une fois intégré dans le xylème de la plante, lieu de la colonisation bactérienne, permet la synthèse de la protéine. Cette dernière est effectivement capable de cibler la bactérie, de limiter sa croissance et de diminuer l'expression des symptômes chez les plants contaminés (Dandekar et al. 2012).

La transgénèse fait donc partie des méthodes de lutte alternatives qui permettraient de limiter l'utilisation d'intrants au vignoble ou de proposer une solution pour lutter contre des maladies pour lesquelles aucun traitement n'existe. Mais ces techniques, toujours en cours d'évaluation, sont pour l'instant interdites en France et ne sont pas encouragées par l'opinion publique. En recherche, la difficulté de la mise en place d'essais sur les plants transgéniques en plein champ liée aux actes d'arrachage pose la question de la consultation des citoyens par les scientifiques (Lemaire et al. 2010). Bien que ces recherches constituent de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de défense, d'autres techniques mieux acceptées doivent être développées.

3.4.5 Utilisation de molécules issues de plantes

En viticulture, peu de solutions commerciales à base de plantes sont actuellement disponibles et efficaces. Pour la lutte contre des insectes comme la cicadelle de la flavescence dorée, des insecticides naturels à base de pyrèthre permettent d'éliminer les larves de cicadelles à condition d'être appliqués régulièrement (Rousseau et al. 2009). Pour lutter contre l'agent pathogène *P. viticola*, l'Organisation Professionnelle de l'Agriculture Biologique en Alsace a mis en place un test montrant l'efficacité de décoctions de plantes à base de prêle et d'ortie en association avec un traitement cuprique. Le produit n'est pas efficace en tant que traitement seul, mais il permet de réduire les doses de cuivre à apporter à la parcelle.

Pour lutter contre la maladie du court-noué, des essais ont été mis en place en conditions contrôlées pour évaluer l'efficacité de l'utilisation de plantes nématocides ou répulsives vis-à-vis de *X. index*. L'objectif de cette étude est de proposer une solution pour réduire le temps de jachère nécessaire avant la plantation de vigne suite à l'arrachage de plants contaminés. Les résultats révèlent que la culture de certaines plantes permet de réduire plus fortement les populations de nématodes qu'un sol nu, c'est le cas de *Lotus corniculatus*, *Lupinus albus*, *Trifolium pratense*, *Medicago* spp. et *Avena sativa* entre autres (Villate et al. 2012). Le mécanisme d'action de ces plantes n'étant pas connu, on peut faire l'hypothèse qu'elles seraient capables de produire des métabolites répulsifs ou toxiques pour les nématodes. En outre, toutes ces plantes sont connues pour leur production de saponines (Walter 1961; Muzquiz et al. 1993; Tava et Odoardi 1996; Kolodziejczyk-Czepas 2012; Luning et Schlosser 1976), composés à action nématocide (Francis et al. 2002). Il est donc possible que l'activité nématocide de ces plantes soit liée à une exsudation de saponines dans le sol.

3.5 Les saponines en tant que traitement permettant de lutter contre une large gamme d'agents pathogènes, un avenir pour la viticulture ?

Les saponines ont déjà prouvé leur intérêt dans de nombreux domaines allant de la médecine, l'agroalimentaire, à l'industrie. Leurs propriétés hémolytiques sont utilisées pour du diagnostic biologique. En outre, les saponines de *Quillaja saponaria* ont un effet stimulateur du système immunitaire, c'est pourquoi elles peuvent être utilisées comme adjuvant dans les vaccins (Rijke 2011). Les saponines ont un intérêt dans l'industrie agroalimentaire (Barron 2011), ces dernières apportent un goût amer aux aliments qui en contiennent. Des études sont également réalisées sur le potentiel de l'apport de saponines dans l'alimentation animale pour la réduction de la méthanogenèse (Kerem 2011). Les propriétés anti-inflammatoires et adaptogènes (Capacité à

stimuler la résistance non spécifique de l'organisme) de certaines saponines sont aussi utilisées dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique (Portet et al. 2011).

En agriculture, leurs caractéristiques sont de plus en plus étudiées, et vu l'importance des saponines endogènes dans la protection de certaines plantes aux agents pathogènes (Papadopoulou et al. 1999), de nombreuses équipes se sont penchées sur l'utilisation des saponines comme traitement contre différents bioagresseurs. Les tests réalisés sont nombreux et concernent un grand nombre de saponines ainsi qu'un grand nombre d'agents pathogènes comme les virus, les bactéries, les champignons, les insectes, les mollusques, les animaux à sang chaud (Francis et al. 2002).

De nombreux tests d'efficacité des saponines contre les champignons phytopathogènes ont été réalisés. Voici une liste non exhaustive d'exemples trouvés dans la littérature. Le traitement de *Fusarium oxysporum* par une solution de saponines isolées de *Medicago spp* peut limiter *in vitro* la croissance du mycélium d'environ 70 % (Jarecka et al. 2008), l'utilisation d'une solution de saponines issues de *Acacia auriculiformis* permet l'inhibition complète de la germination des conidies des agents de moisissure *Aspergillus ochraceous* et *Curvularia lunata* (Mandal et al. 2005). Pour la vigne, des travaux réalisés en partie au LVBE ont permis de montrer que l'utilisation de saponines commerciales issues de *Quillaja saponaria* permet de limiter la croissance du mycélium ainsi que la germination des spores de différentes souches de *B. cinerea* (Fischer et al. 2011).

Les saponines montrent également une action contre les nématodes. C'est le cas des saponines issues de *Medicago spp.* dont l'effet est létal sur *X. index* (Argentieri et al. 2008) mais également sur d'autres nématodes phytopathogènes comme *Meloidogyne incognita*, *Globodera rostochiensis* et *Heterodera carotae* (D'Addabbo et al. 2011). Les saponines commerciales issues de *Q. saponaria* permettent également de tuer ces nématodes vecteurs du GFLV (Fischer et al. 2011).

Les saponines sont d'ores et déjà utilisées dans des formulations de produits destinés à l'agriculture, principalement sous forme d'adjuvants car leur capacité à créer des pores dans les membranes plasmiques facilite la pénétration des substances actives dans les cellules et favorise l'atteinte de la cible d'origine fongique ou végétale par ces substances. L'apport de saponines issues de *Q. saponaria* ou de *Balanites aegyptiaca* dans une formulation contenant du [14C]-2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) permet une meilleure pénétration du produit dans les cellules de *Citrus grandis* par exemple (Chapagain et Wiesman 2006).

D'autres produits à base de saponines sont également disponibles pour la viticulture. Le Moldstim à base de saponines extraites des graines de *Capsicum annuum* est commercialisé comme stimulateur de croissance et permet d'augmenter le rendement des plants de Chardonnay en viticulture (Kirilov et al. 2000). Les produits Moldstim, Pavstim (à base de saponines extraites des graines de *Digitalis*

purpurea) et Ecostim (à base de saponines extraites de *Lycopersicum esculentum*) permettent l'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum* (Lupashku et Kintia 2002) ; enfin, le produit Heads Up à base de saponines de *Chenopodium quinoa* permet de lutter contre *Rhizoctonia solani*, l'agent du zhizoctone brun de la pomme de terre.

Outre ces caractéristiques biocides vis-à-vis d'un grand nombre de bioagresseurs, les saponines sont également plus faiblement nocives pour les mammifères que les produits précédemment utilisés en viticulture. La toxicité des saponines issues de *Q. saponaria*, par exemple, a été évaluée sur des rats. Il a été montré que la dose nécessaire pour atteindre la mortalité de 50% des lots de rats testés (LD50, Lethal Dose 50) est de 3000 mg/kg (US EPA, Office of Pesticide Programs 2007). En comparaison, les produits phytosanitaires retirés du marché en viticulture comme l'arsenite de sodium (utilisé contre les champignons des maladies du bois), le 1,3-dichloropropène, le fenamiphos et l'aldicarbe (utilisés contre les nématodes vecteurs du court-noué) ont une LD50 de respectivement 100, 250, 2,4 et 1 mg/kg.

Les saponines semblent donc être une solution alternative aux produits phytosanitaires efficace contre une large gamme d'agents pathogènes.

4. Objectifs de la thèse et stratégie de recherche

Comme nous avons pu le mettre en évidence dans cette introduction bibliographique, la vigne est une espèce cultivée particulièrement soumise à des pressions exercées par divers agents pathogènes. Le développement de la lutte contre ces différents agents pathogènes repose sur l'acquisition des connaissances liées aux mécanismes de défense mis en place par les plantes. La recherche sur les défenses activées suite à une infection ont été particulièrement étudiées ces dernières années, cependant la résistance constitutive des plantes est également un élément important. En effet, la production de phytoanticipines comme les saponines est un critère déterminant dans la résistance de certaines plantes aux bioagresseurs (Papadopoulou et al. 1999). Nous nous sommes donc intéressés à ces molécules, triterpénoïdes retrouvés chez un grand nombre de plantes afin de déterminer si elles pouvaient avoir un rôle dans la protection de la vigne face à différents agents pathogènes. Différentes questions de recherche structurent ce manuscrit, elles sont posées ci-après et les stratégies de réponse à ces questions sont également présentées.

Quels types de triterpénoïdes sont retrouvés dans différents organes de la vigne ?

Les triterpènes pentacycliques, les saponines et les triterpènes stéroïdiens (phytostérols) appartiennent à la famille des triterpénoïdes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons aux triterpénoïdes associés à la défense des plantes et donc au métabolisme secondaire, le terme triterpénoïde se réfèrera donc uniquement aux triterpènes pentacycliques et aux saponines, les phytostérols étant plutôt associés au métabolisme primaire.

Dans le chapitre I, un état des lieux des connaissances sur la composition en triterpènes présents dans les baies de vigne sera donc établi dans le cadre d'une revue. Puis une extraction et une analyse des composés triterpéniques présents à la surface des baies et des feuilles de différents cépages seront réalisées. Enfin, nous avons voulu savoir si la vigne était capable de produire des saponines. Chez les plantes ligneuse, les saponines sont principalement retrouvées dans l'écorce, c'est le cas de l'arbre du Chili, *Quillaja saponaria* pour lequel on a identifié plus de 80 saponines dans l'écorce. Nous entreprendrons donc d'extraire et d'identifier des saponines dans l'écorce de vigne.

Quelles sont les enzymes capables de produire ce type de composé chez la vigne ?

La production des saponines chez les plantes met en jeu de nombreuses réactions catalysées par différentes enzymes. L'obtention du squelette triterpénique est le fruit de l'action de triterpène synthases impliquées dans la cyclisation de la molécule de base, l'oxydosqualène. Nous nous sommes particulièrement intéressés à ces enzymes dans le cadre de cette thèse.

Dans le chapitre II des résultats, nous identifierons, dans le génome de *V. vinifera* cv PN40024 (entièrement séquencé), les gènes présentant des homologies avec des triterpène synthases identifiées chez d'autres plantes. Puis, afin de comparer l'expression de ces gènes aux teneurs en différents triterpénoïdes mesurées dans le chapitre 1, nous évaluerons leur expression par PCR quantitative dans différents organes, chez différents cépages et en réponse à des stress.

Des traitements à base de saponines permettraient-ils de lutter contre des maladies majeures de la vigne contre lesquelles aucun moyen de lutte n'est actuellement disponible ?

Les saponines ont été testées et sont efficaces pour lutter contre une large gamme d'agents pathogènes (Francis et al. 2002). Les saponines de la vigne n'ayant pas encore été identifiées ni extraites en quantités suffisantes au début de cette thèse, nous nous sommes donc penchés sur l'utilisation de saponines issues d'autres plantes pour tenter de trouver un moyen de lutte contre des agents pathogènes de la vigne contre lesquels aucun moyen de lutte n'existe actuellement : les agents des maladies du bois et de la maladie du court-noué. Le chapitre III présentera tout d'abord des tests réalisés *in vitro* sur différentes souches de champignons associées aux maladies du bois. Des tests seront également réalisés pour évaluer l'effet de saponines sur la survie de deux nématodes vecteurs de virus responsables de la maladie du court-noué en milieu liquide et en sol. Enfin, afin de respecter les exigences de respect de l'environnement, l'impact de ces traitements sur différents bioindicateurs de l'environnement de la vigne sera testé.

Chacun des chapitres comportera une partie introduction et une partie résultats-discussion ; une discussion générale conclura et apportera les perspectives de ces travaux.

Chapitre 1 : Identification de triterpénoïdes chez la vigne

1. Introduction

Tous les organes aériens des plantes supérieures sont recouverts d'une couche cireuse, interface entre les tissus de la plante et l'environnement. Cette couche permet de réduire les pertes d'eau dues à la transpiration, de contrôler les échanges gazeux, mais elle sert également de barrière contre les agents pathogènes (Müller et Riederer 2005). Différentes recherches ont été menées pour identifier les composés de cette couche cireuse les plus hautement associés à la résistance des plantes face aux agressions. Il a par exemple été prouvé que la teneur en composés phénoliques de la couche cireuse des baies de Sauvignon Blanc est associée à sa résistance à une infection par *Botrytis cinerea* (Deytieux-Belleau et al. 2009).

Les triterpénoïdes présentent une grande diversité structurale et sont très largement répandus chez les plantes. Comme nous l'avons présenté en introduction, beaucoup d'entre eux sont connus pour leur toxicité contre différents agents pathogènes comme des insectes, des champignons ou encore des bactéries (Becker et al. 2005; Mallavadhani et al. 2003; Lugemwa et al. 1990). L'implication de triterpénoïdes dans la résistance de la vigne aux bioagresseurs a cependant été peu étudiée.

Il semble donc intéressant, dans un premier temps, de pouvoir déterminer quels triterpénoïdes la vigne est capable de produire. Pour cela, nous avons analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS) la composition en triterpénoïdes de la cire de baies et de feuilles issues de différents cépages. Ces premières descriptions, mises en relation avec la sensibilité ou l'insensibilité connue de différents cépages à divers bioagresseurs, pourraient permettre de corrélérer la composition en triterpénoïdes avec la résistance de certains cépages face à des agressions d'agents pathogènes.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux saponines, molécules actives contre une large gamme d'agents pathogènes et retrouvées chez de nombreuses plantes. En partant de l'hypothèse que, comme chez de nombreuses plantes ligneuses, les saponines peuvent être retrouvées dans l'écorce, nous avons entrepris d'extraire et d'identifier des saponines chez la vigne.

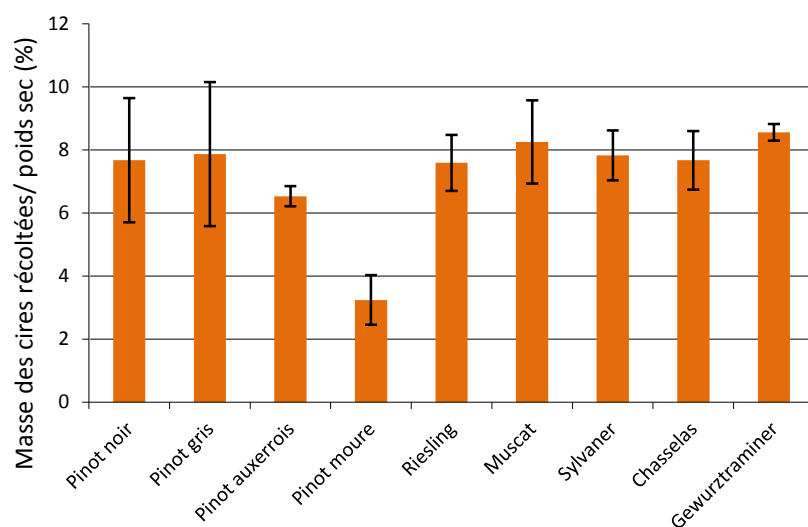


Figure 32 : Masse des cires (% du poids sec) présentes à la surface des baies de différents cépages à véraison (T2). Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

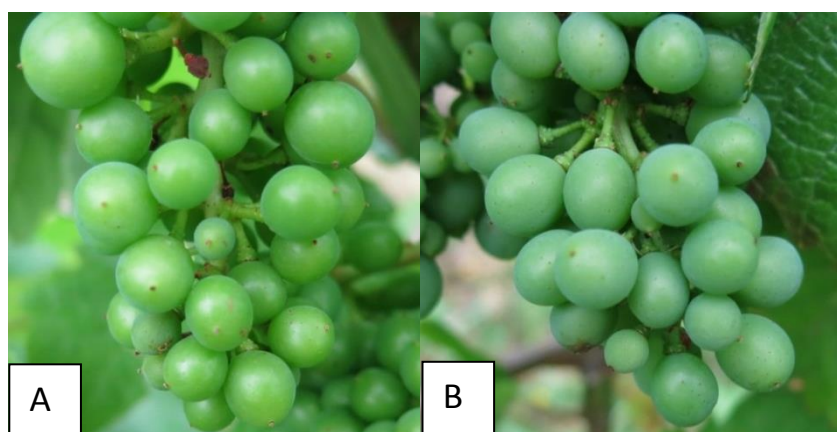


Figure 33 : Baies de Pinot moure à aspect luisant (A) et baies de Pinot noir à aspect plus opaque (B), à la véraison (stade T2)

2. Identification et quantification de triterpénoïdes à la surface des baies et des feuilles de différents cépages de vigne

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Anna Szakiel de l'Université de Varsovie en Pologne.

Les analyses ont été faites sur 8 cépages: Pinot noir, Pinot gris, Pinot auxerrois, Riesling, Muscat, Chasselas, Sylvaner et Gewurztraminer ; et un cépage particulier, le Pinot moure. Ce cépage dérive du Pinot noir et est caractérisé par un aspect des baies plus brillant que les autres cépages. Les analyses ont été faites sur des feuilles récoltées le 07/07/11 et des baies récoltées à trois dates différentes représentatives des différents stades de maturation : le 27/06/11 (stade petit pois, T1), le 25/07/11 (à la véraison, T2) et le 22/08/11 (stade mature, T3).

Les extraits de cire des baies et des feuilles ont été obtenus par un bain de 30 secondes dans du chloroforme, méthode qui permet d'extraire 30 à 73% des cires cuticulaires (Santier et Chamel 1998), mais qui permet d'éviter d'extraire les composés présents plus en profondeur dans les tissus. L'identification et la quantification des triterpénoïdes pentacycliques a ensuite été réalisée par GC-MS après traitement des échantillons et comparaison à des gammes étalon de composés de référence.

2.1 Identification des triterpénoïdes à la surface des baies de différents cépages de vigne et suivi de l'évolution de leurs teneurs

2.1.1 Etat des lieux des connaissances sur la composition en triterpénoïdes des baies

Un travail préliminaire de synthèse des connaissances sur la composition en triterpénoïdes retrouvés dans les baies a été réalisé dans le cadre de la collaboration et a abouti à la publication d'une revue décrivant les principaux triterpénoïdes retrouvés dans la pellicule de différents fruits économiquement importants: la pomme, le raisin, l'olive et la tomate. Les caractéristiques pharmacologiques des composés retrouvés dans ces différents fruits sont développées. J'ai été chargée de la rédaction du chapitre concernant le raisin dans la revue présentée en fin de ce chapitre (Szakiel et al. 2012). Après une brève introduction sur les bienfaits de la consommation de raisin, le paragraphe sur le raisin aborde l'identification et la quantification des triterpénoïdes majeurs retrouvés à la surface des baies. L'acide oléanolique est le principal composé retrouvé, suivi de l'aldéhyde oléanolique et de divers phytostérols. Dans le point suivant, le rôle de l'acide oléanolique

Tableau 2 : Taux de réduction de la teneur en triterpénoïdes totale et en acide oléanolique à la surface des baies au cours de la maturation (entre T1 et T3) chez différents cépages

Cépage	Teneurs perdues (en %)	
	Triterpénoïdes	Acide oléanolique
Gewurztraminer	28	32
Riesling	17	22
Muscat	17	24
Sylvaner	38	44
Pinot noir	37	42
Pinot moure	34	34

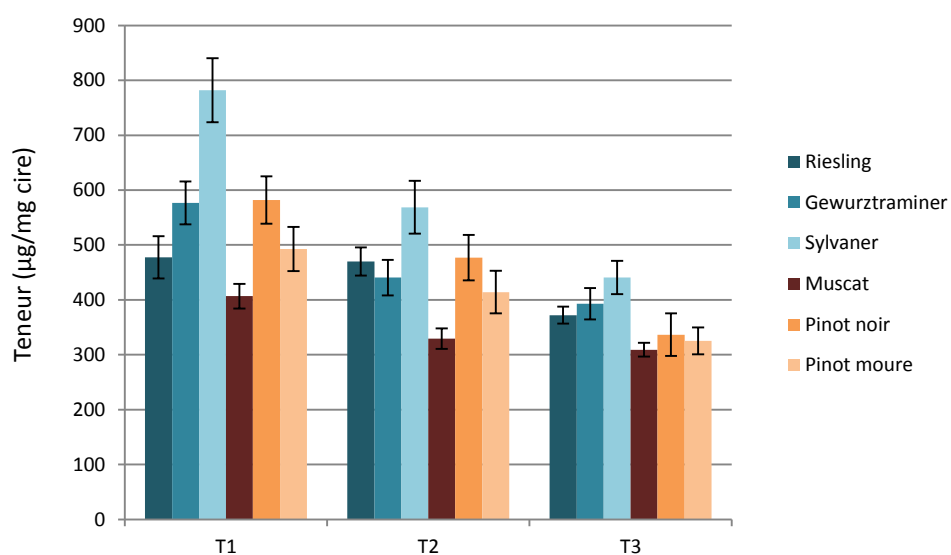


Figure 34 : Evolution de la teneur en acide oléanolique à la surface des baies de différents cépages au cours de la maturation. T1 : stade petit pois, T2 : stade véraison, T3 : stade mature. Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

dans la mise en place de la structure cristalline de la cuticule est mis en évidence. Enfin, le rôle pharmacologique des différents triterpénoïdes identifiés à la surface des baies est décrit et permet d'expliquer les bienfaits de la consommation de raisin tels que la réduction de l'incidence des maladies chroniques et du vieillissement (Szakiel et al. 2012).

2.1.2 Evolution des teneurs générales en triterpénoïdes et en acide oléanolique, composé majoritaire de la cire des baies

Dans cette étude, les teneurs en triterpénoïdes de 6 cépages ont été évaluées (Gewurztraminer, Riesling, Muscat, Sylvaner, Pinot noir et Pinot moure), les analyses concernant les 3 cépages supplémentaires (Pinot gris, Pinot auxerrois et Chasselas) sont encore en cours.

De façon générale, la proportion de cire par rapport au poids sec ne varie pas significativement au cours de la maturation des baies, elle passe en moyenne de $4,69 \pm 0,97$ mg/g de poids sec au stade petit poids à $4,45 \pm 0,67$ mg/g de poids sec au stade mature. Seule la proportion de cires du Pinot moure évolue au cours de la maturation, le taux de cires présent à la surface des baies de ce cépage diffère des autres cépages à la véraison (**Figure 32**). Cette quantification confirme les observations phénotypiques, car les baies de Pinot moure ont un aspect moins opaque que les baies des autres cépages (**Figure 33**). Lors de la quantification de la masse de cires au stade T3, à maturité des baies, aucune différence significative n'a été observée entre les différents cépages.

Contrairement à la masse de cires totales qui reste proportionnelle à la masse de poids sec des baies au cours de la maturation, la teneur totale en triterpénoïdes diminue fortement. Cette évolution est plus ou moins importante selon le cépage et va d'une diminution de la teneur en triterpénoïdes totaux de 17% chez le Riesling et le Muscat à 38% chez le Sylvaner (**Tableau 2**). Dans les baies, conformément à ce qui était attendu, le composé majoritaire est l'acide oléanolique (Radler et Horn 1965; Yamamura 1983; Commenil et al. 1997). Dans nos échantillons, ce composé représente en moyenne 92% des teneurs en triterpénoïdes. Au cours de la maturation, nous avons pu remarquer une forte réduction de sa concentration dans la cire extraite, ce taux est supérieur au taux de réduction de la teneur totale en triterpénoïdes dans les baies (**Tableau 2**). La réduction des teneurs en acide oléanolique expliquerait donc majoritairement cette diminution.

Les teneurs en acide oléanolique diffèrent selon les cépages. Le Sylvaner est celui qui en produit le plus tandis que le Muscat est celui qui en est le plus pauvre (**Figure 34**). Ces différences sont particulièrement observables à T1 et s'atténuent au cours de la maturation.

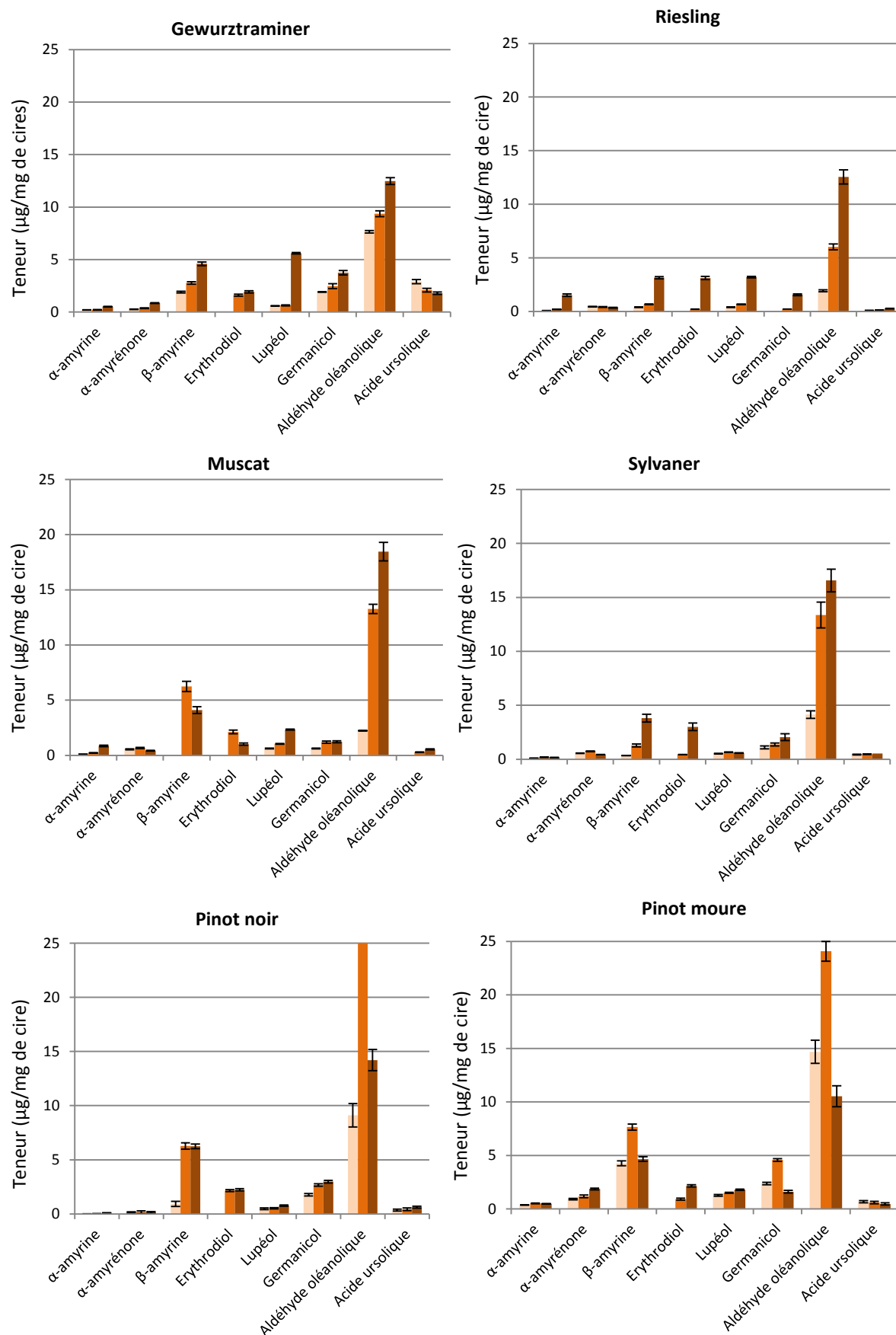


Figure 35 : Evolution de la teneur en différents triterpénoïdes à la surface des baies au cours de la maturation. T1 : ■ ; T2 : ■ ; T3 : ■. Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

2.1.3 Evolution des teneurs en triterpénoïdes non majoritaires et comparaison des cépages

Outre l'acide oléanolique, différents triterpènes sont retrouvés dans les baies des différents cépages ; il s'agit principalement de l' α -amyrine, l' α -amyrenone, la β -amyrine, l'erythrodiol, le lupéol, le germanicol, l'aldéhyde oléanolique et l'acide ursolique. Le rôle exact de ces composés pour la plante n'a pas été clairement défini, très peu de données sont disponibles dans la bibliographie à ce sujet.

Les composés α -amyrine, α -amyrenone et acide ursolique, sont retrouvés en faible quantité comparativement aux autres triterpènes (**Figure 35**), les teneurs retrouvées sont en général inférieures à 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cires. Il est donc difficile d'établir un constat quant à leur présence différentielle chez les cépages ou au cours de la maturation.

La concentration en β -amyrine diffère chez les cépages étudiés (**Figure 35**) : elle augmente au cours de la maturation chez le Gewurztraminer, elle est faible aux stades T1 et T2 puis augmente au stade T3 ; chez le Riesling et le Sylvaner, elle est faible au stade T1 puis augmente à T2 et reste constante chez le Pinot noir. Enfin, le Pinot moure et le Muscat se distinguent par un pic de β -amyrine à la véraison, de l'ordre de 6 à 7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cires.

L'erythrodiol est un composé que l'on ne retrouve pas ou très peu chez les baies au stade petit pois (**Figure 35**), c'est un triterpène plutôt associé à la maturation des baies, puisqu'il est présent quasiment uniquement au stade T3 chez le Riesling, le Sylvaner et le Pinot moure. Le lupéol est également un composé dont la concentration dans les cires augmente avec la maturation chez nos différents cépages (**Figure 35**). Les concentrations en germanicol dans la cire des baies augmentent avec la maturation (**Figure 35**).

L'aldéhyde oléanolique est le composé dont la teneur est la plus élevée après l'acide oléanolique, avec des teneurs au stade mature variant de 10 à 18 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cires. C'est un triterpène associé également à la maturation des baies (**Figure 35**), sauf chez les deux Pinots étudiés, chez lesquels on le retrouve principalement lors de la véraison. Si l'on confronte l'évolution des teneurs en ce composé avec l'acide oléanolique dont les teneurs diminuent au cours de la maturation, on peut supposer qu'une partie de l'acide oléanolique subit des transformations pour former de nouveaux triterpénoïdes retrouvés dans les baies à des stades avancés du développement.

En conclusion, certaines caractéristiques sont partagées par l'ensemble des cépages, c'est le cas des teneurs en acide oléanolique qui diminuent lors du développement des fruits. Cependant, chaque cépage est caractérisé par un type propre d'évolution de la composition en triterpénoïdes. Ces

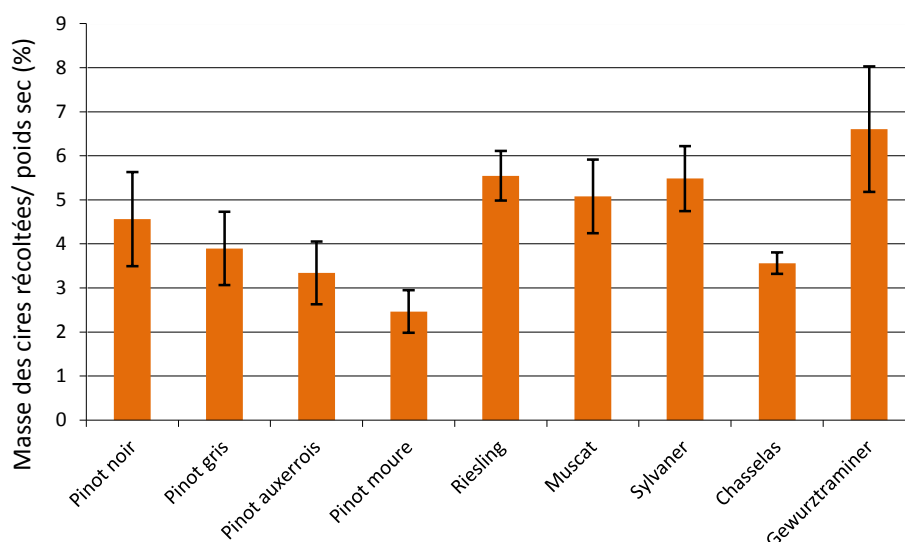


Figure 36 : Proportion de cires récoltées à la surface des feuilles adultes de différents cépages. Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

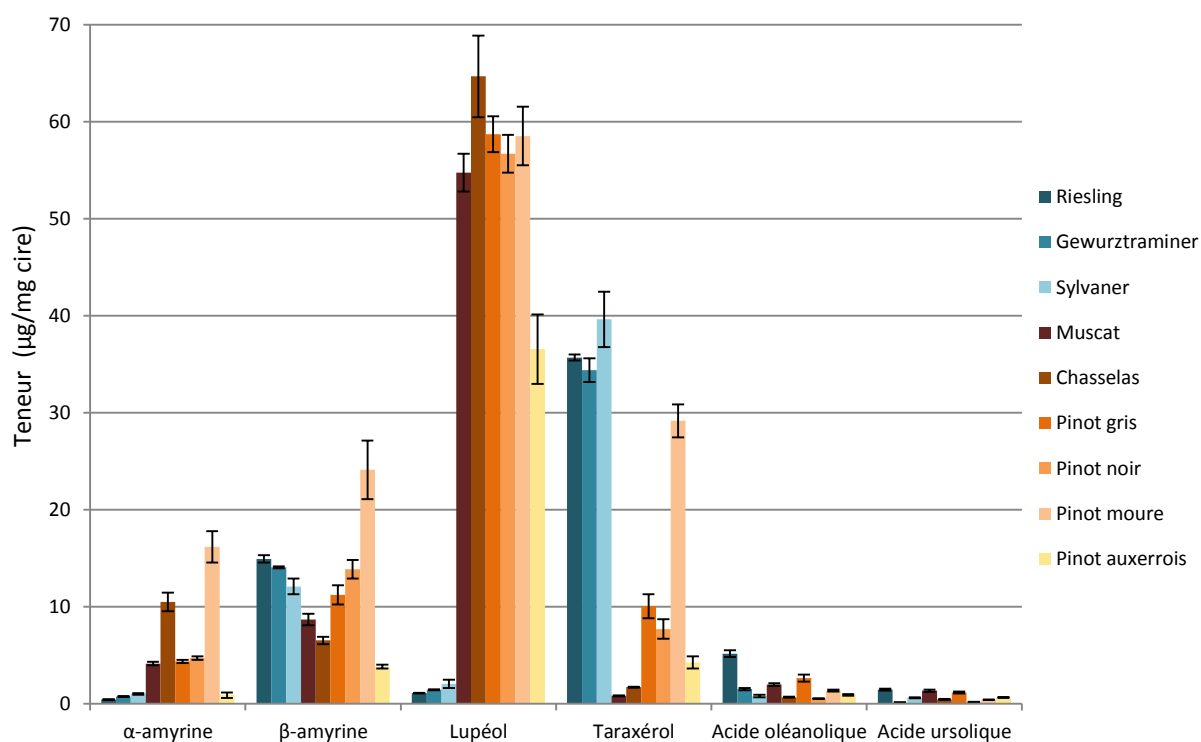


Figure 37 : Teneurs en triterpénoïdes à la surface des feuilles adultes de différents cépages. Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

résultats restent à nuancer car ces baies ont été récoltées au vignoble, en conditions non contrôlées. On peut supposer que la composition des cires dépend de nombreux paramètres comme le stress hydrique, l'ensoleillement, voire le porte-greffe ou le clone. Il a par exemple été montré que le métabolisme des terpènes était perturbé sous l'influence d'une exposition aux UVs (Gil et al. 2012). De même, dans leur revue, Szakiel et al. (2011) décrivent les facteurs influençant la production de saponines par une plante, il peut s'agir du climat, de la région ou de la saison.

2.2 Identification des triterpénoïdes à la surface des feuilles de différents cépages de vigne

Les feuilles des 9 cépages étudiés ont été récoltées à une seule date, les feuilles choisies correspondaient au stade mature, mais non sénescents.

La proportion de cires collectée à la surface des feuilles par rapport au poids sec varie selon le cépage; les Pinots et le Chasselas sont effectivement plus pauvres en cires que les autres cépages (**Figure 36**).

Tandis qu'à la surface des baies les teneurs en triterpénoïdes sont de l'ordre de 350 à 790 $\mu\text{g/g}$ de cire, la surface des feuilles est moins riche en ces composés, de l'ordre de 86 à 166 $\mu\text{g/mg}$ de cire. Ceci s'explique en particulier par le fait que la surface des feuilles est pauvre en acide oléanolique alors qu'il est présent en grande quantité à la surface des baies et représente environ 92% des triterpénoïdes qui y sont retrouvés.

Les principaux triterpènes retrouvés à la surface des feuilles sont l' α -amyrine, la β -amyrine, le lupéol, le taraxérol, l'acide oléanolique et l'acide ursolique. Le taraxérol est un composé qui n'est pas retrouvé à la surface des baies.

L'acide oléanolique et l'acide ursolique sont les triterpènes dont les teneurs sont les plus faibles à la surface des feuilles, leurs teneurs sont en général inférieures à 1 $\mu\text{g/mg}$ de cires (**Figure 37**).

Les teneurs en α -amyrine et β -amyrine diffèrent selon le cépage (**Figure 37**). La concentration en α -amyrine varie de 0,5 $\mu\text{g/mg}$ chez le Riesling à 16 $\mu\text{g/mg}$ de cires chez le Pinot moure. Les teneurs en β -amyrine sont également les plus élevées chez le Pinot moure avec 24 $\mu\text{g/mg}$ de cires, tandis que le Pinot auxerrois en contient uniquement 3,8 $\mu\text{g/mg}$. Il faut cependant retenir que de trop forts taux de β -amyrine dans la cire des feuilles peuvent être néfaste pour l'état hydrique de la plante, puisque la surexpression d'une β -amyrine synthase dans des feuilles de *Arabidopsis thaliana* est associée à

une réduction de l'efficacité de la barrière cuticulaire vis-à-vis de l'évaporation de l'eau (Buschhaus et Jetter 2012).

Les composés les plus abondants sont le lupéol et le taraxérol (**Figure 37**). Ces deux composés permettent de distinguer deux groupes de cépages. Le groupe des cépages pauvres en lupéol (teneur inférieure à 2 µg/mg de cires) et riches en taraxérol (teneur supérieure à 35 µg/mg de cires), est représenté par le Riesling, le Gewurztraminer et le Sylvaner. L'autre groupe riche en lupéol, (teneur supérieure à 55 µg/mg de cires), et pauvre en taraxérol (teneur inférieure à 10 µg/mg) est représenté par le Muscat, le Chasselas, et les 3 Pinots. Le Pinot moure est un cépage dont la composition diffère par rapport aux autres cépages puisqu'il est à la fois riche en lupéol et en taraxérol. Concernant les taux différentiels en taraxérol et en lupéol, on peut se demander si les voies de biosynthèse de l'un et l'autre ne seraient pas interdépendantes. Ceci reste encore à vérifier.

Le but de cette étude étant de déterminer s'il est possible de relier la composition en triterpénoïdes à un phénotype de résistance face aux infections, il est intéressant de vérifier si les cépages appartenant aux deux groupes différents créés selon la teneur en lupéol et en taraxérol à la surface des feuilles ont des sensibilités différentes aux infections foliaires. En consultant la bibliographie, les études de Doster et Schnathorst (1985) ainsi que Boso et Kassemayer (2008) sur l'évaluation de la sensibilité de différents cépages au mildiou ou à l'oïdium révèlent que des cépages appartenant à chacun des deux groupes présentent une sensibilité similaire à une infection par les agents de ces maladies. L'effet de ces molécules est peut être minimisé par l'effet d'autres molécules présentes à la surface des feuilles et que nous n'avons pas étudiées. Les hydrocarbures, par exemple, sont présents en plus grandes quantités dans les feuilles et certains sont impliqués dans la résistance à *Plasmopara viticola* (Batovska et al. 2009a; Batovska et al. 2009b). De même, les phytoalexines comme le resvératrol sont accumulés dans les feuilles et permettent d'augmenter les niveaux de résistance face aux agressions (Malacarne et al. 2011).



Figure 38 : Chromatographie sur couche mince, élution d'extraits d'écorce de vigne et de quillaja. Solvant de migration : Chloroforme/Méthanol/eau (15/8/1,5) et révélation par aspersion d'acide sulfurique 20% et chauffage

3. Recherche de saponines chez la vigne

Chez la vigne, aucune structure de saponine n'a été caractérisée à ce jour. Une étude a été réalisée pour déterminer la composition en saponines du marc de raisin, via des extractions à l'aide de différents systèmes de solvants (Spanghero et al. 2009). Ceci a mené à une estimation de la quantité de saponines, mais aucune détermination de structure n'a été faite. S'agit-il donc bien de saponines ? Récemment, Marchal et al. (2011) ont détecté et identifié des saponines dans le vin, mais ces saponines proviendraient du bois de chêne des barriques contenant le vin. Au vu du manque d'information concernant la présence de saponines chez la vigne, nous avons décidé de faire des extractions à partir de l'écorce de vigne, afin de savoir si la vigne est capable de produire des saponines en quantité significative, et si oui de déterminer leur structure.

Pour identifier des molécules d'intérêt, il faut procéder à trois étapes importantes : l'extraction, la purification et l'identification.

3.1 Extraction et la séparation des différentes familles de composés

Ces premières étapes ont été réalisées en collaboration avec le Pr Max Henry, à l'Université de pharmacie de Nancy. Des sarments d'un an de Gewurztraminer ont été épluchés, l'écorce a été broyée puis placée aux ultrasons dans un mélange MeOH:Eau (50:50). L'extraction à partir d'écorce de *Quillaja saponaria* a été réalisée parallèlement afin d'avoir un témoin positif. Après dépôt des extraits concentrés sur chromatographie sur couche mince (CCM) et élution, il a été possible d'observer une tache caractéristique chez le quillaja (**Figure 38**). Cette tache est retrouvée de façon caractéristique et correspond à la présence de saponines (Wagner et Baldt 2009). La seule conclusion qu'il est possible de tirer à partir de cette comparaison est que si la vigne produit des saponines, alors elles seraient présentes en plus faible quantité que chez le quillaja (plante connue comme étant très riche en saponines), et, dans ces conditions de solvant, elles seraient également extraites avec une grande quantité d'autres composés (**Figure 38**).

Il a donc été nécessaire de séparer différentes fractions de cet extrait brut réalisé en solution hydro-méthanolique. La première purification a été réalisée par DCCC (Droplet Counter Current Chromatography), chromatographie liquide-liquide permettant de séparer les composés selon leur affinité pour deux phases liquides de polarité différente. Les échantillons obtenus après purification

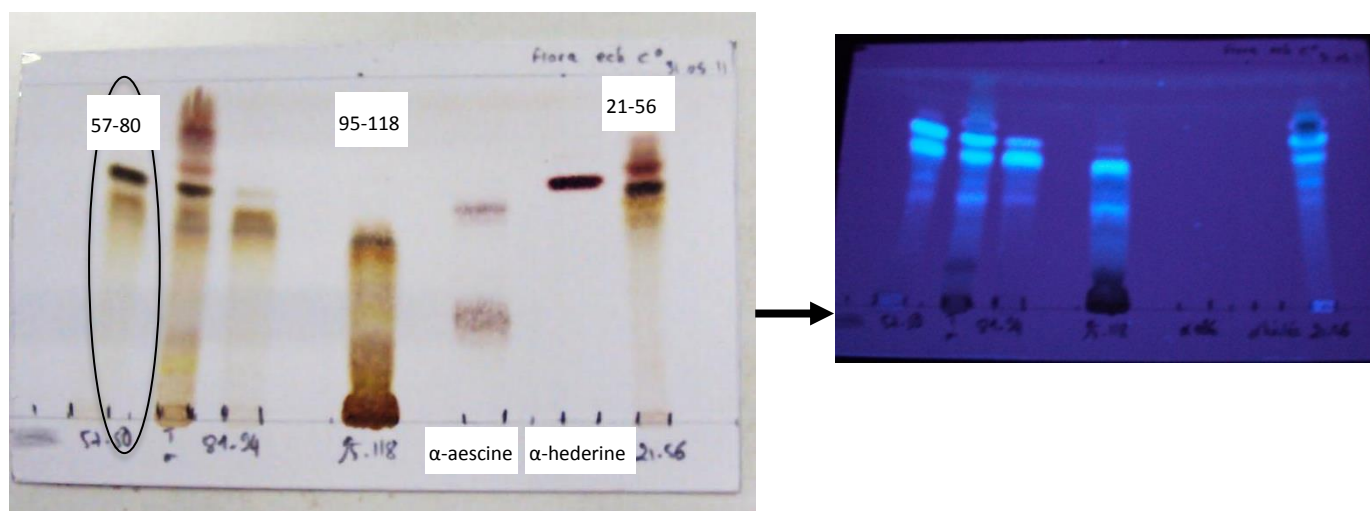


Figure 39: Chromatographie sur couche mince, échantillons obtenus après purification de l'extrait brut d'écorce de vigne par DCCC, après chauffage (à gauche) et avant chauffage et après passage sous UV (à droite). Les saponines de référence qui ont été utilisées sont l'α-aescine et l'α-hédérine

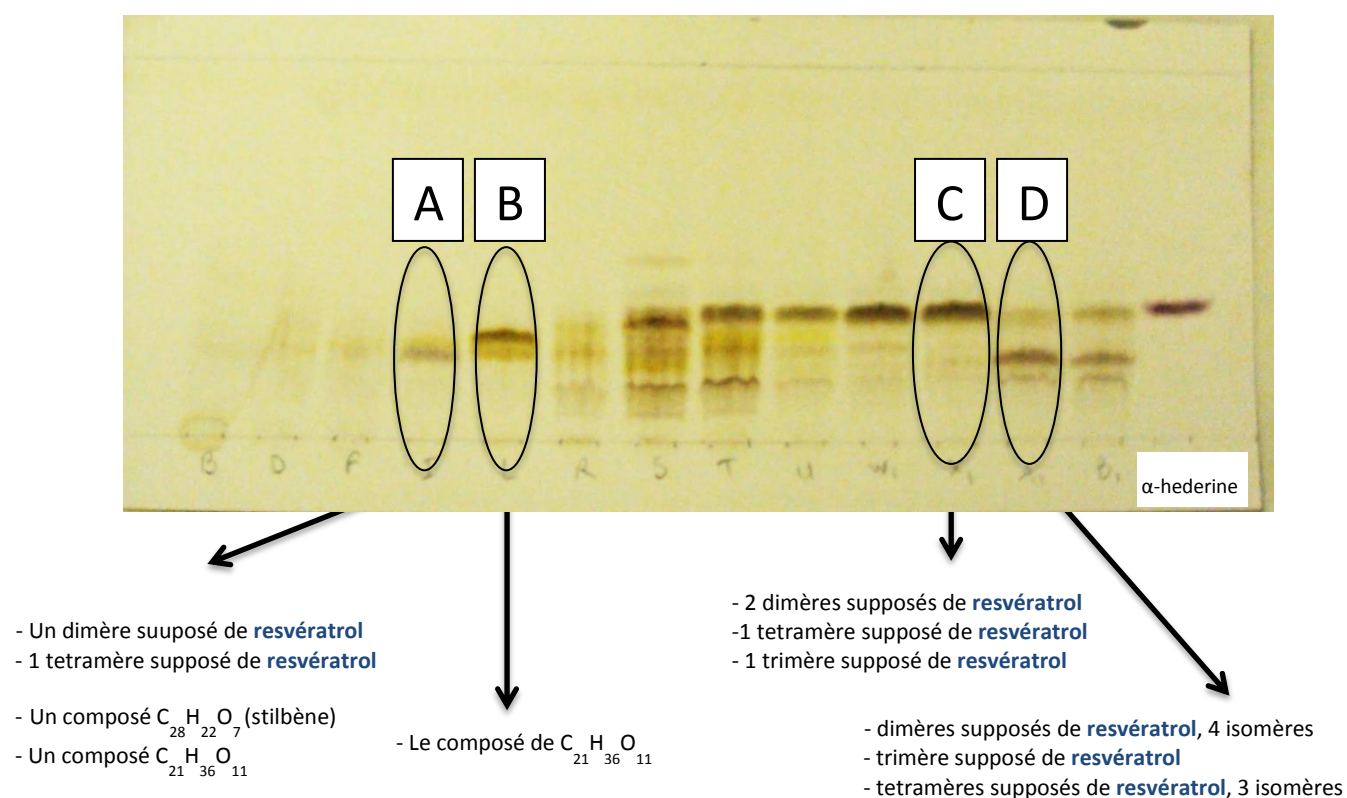


Figure 40: Chromatographie sur couche mince, échantillons obtenus après purification de l'extrait 57-80 par HPLC préparative. Les lettres correspondent aux échantillons analysés par LC-FTMS, dont la nature des espèces majoritaires est supposée sur la base de leur formule brute

par DCCC sont rassemblés selon leur profil chromatographique en CCM. Ils sont composés d'un nombre important de molécules, nous avons cependant pu comparer les rapports frontaux de ces échantillons à ceux de saponines connues : l' α -aescine et l' α -hédérine (**Figure 39**). La révélation de la plaque aux UV, permet d'observer que les produits majoritaires sont fluorescents aux UV.

Pour poursuivre la purification, nous avons choisi l'échantillon contenant une diversité de molécules moindre et présentant un rapport frontal proche des saponines témoin. L'échantillon rassemblant les tubes 57 à 80 collectés après DCCC a ainsi été choisi (piste entourée de la **figure 39**). Cet échantillon a donc été purifié par HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) préparative via un gradient de méthanol et d'eau. Ceci a permis d'obtenir de nouveaux échantillons qui ont été regroupés selon leur profil chromatographique en CCM.

3.2 Identification des composés majoritaires observés

Les quatre fractions dans lesquelles les produits semblaient mieux séparés ont été analysés par LC-FTMS (Liquid Chromatography Fourier Transform Mass Spectrometry) en collaboration avec le Dr Axel Marchal à l'ISVV de Bordeaux, elles sont nommées A, B, C et D (**Figure 40**). Dans l'extrait A, les formules brutes de 4 composés majoritaires ont pu être identifiées, deux d'entre elles correspondent à la composition d'un dimère et d'un monomère de resvératrol. De tels stilbènes ont déjà été identifiés dans l'écorce de vigne (Bavaresco et al. 1997; Bavaresco et al. 1999) et sont connus pour être fluorescents aux UV (Poutaraud et al. 2008), ce qui expliquerait nos observations en **figure 39**. Un autre composé de formule brute $C_{28}H_{22}O_7$, pouvant appartenir à la famille des stilbènes, et une molécule de formule brute $C_{21}H_{36}O_{11}$ ont également été identifiés. L'extrait B contient majoritairement le composé de formule brute $C_{21}H_{36}O_{11}$. Les extraits C et D sont caractérisés par la présence majoritaire de composés pouvant vraisemblablement être des dimères, trimères et tétramères de resvératrol.

Les composés majoritaires retrouvés dans les extraits retenus ne sont donc ni des triterpènes, ni des saponines. Nous avons alors réalisé des analyses des fractions 21-56 et 95-118 (**Figure 39**). Leur profil chromatographique en LC-FTMS étant beaucoup plus complexe, il n'a pas été possible de déterminer la formule brute des composés majoritaires. La stratégie adoptée a donc été de vérifier si des triterpènes identifiés chez la vigne (paragraphe 2. de ce chapitre) et connus pour être des génines pouvaient être retrouvés dans l'écorce. Pour cela, les masses monoisotopiques des ions quasi-moléculaires $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ de ces triterpènes ont été calculées. Un chromatogramme LC-FTMS des ions extraits a été construit, il permet de n'indiquer que les ions compris dans une fenêtre de 5

ppm autour de la masse théorique de l'ion ciblé. Cette analyse a permis de montrer la présence d'un fragment de formule brute $C_{30}H_{48}O_3$ correspondant à l'acide oléanolique. Dans ces extraits, des molécules présentes en très faible quantité, de formule brute $C_{36}H_{54}O_{11}$ et $C_{36}H_{54}O_{10}$ pourraient correspondre à des triterpènes glycosylés. Ceci reste hypothétique, il faudrait vérifier cela par résonance magnétique nucléaire (RMN) après purification des espèces.

Cette analyse préliminaire sur l'existence potentielle de saponines dans l'écorce de vigne nous montre que la présence de tels composés n'a pas été clairement mise en évidence. S'ils sont présents, ils le sont dans des quantités très faibles. En effet, les composés qui pourraient être des saponines sont issus d'un extrait de 500 g d'écorce et sont présents en quantités infimes. Pour déterminer de façon certaine leur structure, il faudrait partir sur des masses beaucoup plus importantes d'écorce, le travail de purification serait certainement très long puisque l'écorce de vigne contient de nombreux métabolites, et enfin l'identification de saponines n'est pas certaine. Dans le cadre de ma thèse, nous avons décidé de ne pas poursuivre l'identification.

Publication n°1 : Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids.

A. SZAKIEL, C. PACZKOWSKI, F. PENSEC et C. BERTSCH

Phytochemistry reviews, 11, 263-284

***Chapitre 2 :
Identification et
étude d'expression de
gènes codant des
triterpène synthases
chez la vigne***

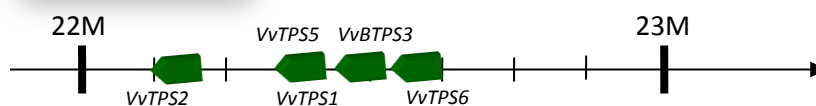
1. Introduction

La vigne est une espèce végétale connue pour sa production particulière de métabolites secondaires en réponse à des infections. La production de phytoalexines comme les stilbènes a été largement décrite (Chong et al. 2009). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une autre classe de molécules, les phytoanticipines, préformées dans les plantes et dont le potentiel de toxicité envers des agents pathogènes est également intéressant. Plusieurs molécules de ce type ont été identifiées, c'est le cas des triterpénoïdes, groupe de molécules comprenant les triterpènes libres tels que l'acide oléanolique ou le lupéol et les triterpènes glycosylés, les saponines. Nous avons identifié des teneurs importantes en triterpènes libres à la surface des baies et des feuilles de *V. vinifera* dans le chapitre 1. Dans la suite de ce travail, nous avons identifié et étudié l'expression des gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse du squelette triterpénique chez la vigne, oxydosqualène cyclases (OSCs). Nous nous sommes particulièrement intéressés aux OSCs capables de former le cation dammarenyl à l'origine des triterpènes libres tels que la β -amyrine, le lupéol ou encore le taraxérol que nous avons appelées triterpène synthases (TPS). Ces gènes n'ayant pas été caractérisés chez la vigne, une analyse bioinformatique nous a permis d'identifier des gènes (*VvTPS*) présentant des similarités de séquence avec des gènes codant des TPS déjà caractérisées. Une analyse de l'expression des gènes candidats a également été réalisée dans différents organes de la vigne et comparée aux données de la bibliographie. Les niveaux d'expression des gènes retenus ont été comparés dans les feuilles de différents cépages. Enfin, il a semblé intéressant de vérifier si ces gènes pouvaient être induits en réponse à des infections par des champignons ou des oomycètes ou si leur niveau d'expression était constant quelles que soient les conditions environnementales.

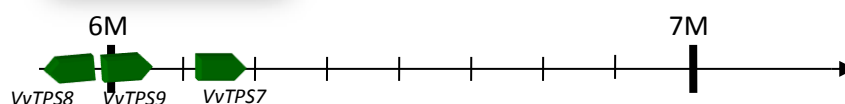
Tableau 3 : Correspondance entre le nom des gènes retenus sur le Génoscope et les numéros qui leur ont été attribués pour notre étude

N° donné par le Génoscope	Nom attribué au gène	Nom attribué à la protéine
GSVIVT01029489001	<i>VvTPS1</i>	TPS1
GSVIVT01029508001	<i>VvTPS2</i>	TPS2
GSVIVT01029481001	<i>VvTPS3</i>	TPS3
GSVIVT01029488001	<i>VvTPS5</i>	TPS5
GSVIVT01029474001	<i>VvTPS6</i>	TPS6
GSVIVT01021494001	<i>VvTPS7</i>	TPS7
GSVIVT01021473001	<i>VvTPS8</i>	TPS8
GSVIVT01021474001	<i>VvTPS9</i>	TPS9
GSVIVT01032217001	<i>VvTPS10</i>	TPS10

Chromosome 9



Chromosome 10



Chromosome 11

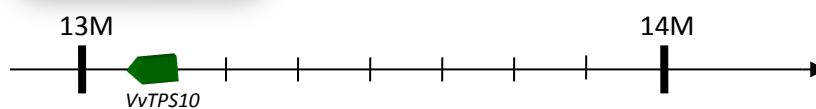


Figure 41 : Localisation des *VvTPS* sur les chromosomes de la vigne

2. Identification et phylogénie des gènes codant des triterpène synthases candidates chez la vigne

2.1 Identification et positionnement des gènes codant des triterpène synthases candidates dans le génome de la vigne

La synthèse des triterpènes libres est réalisée sous le contrôle d'enzymes que nous avons appelées triterpène synthases. Chez la vigne, les TPS n'ont pas été décrites fonctionnellement. L'étude que nous réalisons en collaboration avec le Dr Marc Fischer (INRA, Colmar) est donc basée sur des gènes candidats présentant de fortes similarités avec des gènes codant des TPS décrites chez d'autres plantes, ils seront notés *VvTPS* pour plus de clarté.

La stratégie adoptée a été de rechercher par BAST sur le site du Génoscope (www.genoscope.cns.fr) des gènes de la vigne ayant des similarités de séquences avec des gènes codant des TPS connues. D'après cette recherche, 9 séquences de *VvTPS* ont été retenues. Nous en avons identifiées 10 au départ, mais deux d'entre elles (*VvTPS3* et *VvTPS 4*) correspondent au même gène et étaient à assembler en un seul fragment (d'après le site softberry, Cf Matériel et méthodes), ceci explique le fait qu'elles soient numérotées de 1 à 10 bien qu'il n'y ait que 9 gènes (**Tableau 3**).

La particularité du gène *VvTPS10* est que la région dans laquelle il est situé contient à proximité de deux séquences codant des cytochromes P450. Ces enzymes catalysent des oxydations et ont notamment un rôle dans l'oxydation des génines (Werck-Reichhart et Feyereisen 2000). Il est possible que ces gènes forment un cluster impliqué dans la synthèse d'un triterpène particulier chez la vigne comme cela a été démontré pour la biosynthèse de l'avenacine (Qi et al. 2004).

Les séquences identifiées sont localisées sur trois chromosomes différents : le 9, le 10 et le 11 (**Figure 41**) et sont très proches les unes des autres sur chaque chromosome. Les séquences *VvTPS1*, 2, 3, 5, 6, 8 et 10 sont orientées en antisens tandis que les séquences *VvTPS7* et 9 sont orientées en sens. L'alignement de la séquence codante de ces gènes proches montre que leur séquence est très conservée et suggère que ces gènes pourraient être issus de duplications.

2.2 Phylogénie des gènes codant des triterpène synthases candidates de la vigne

Comme nous avons pu le décrire dans l'introduction, les OSCs sont capables de modifier le 2,3oxydosqualène afin de former une grande diversité de triterpènes. D'une part le cation

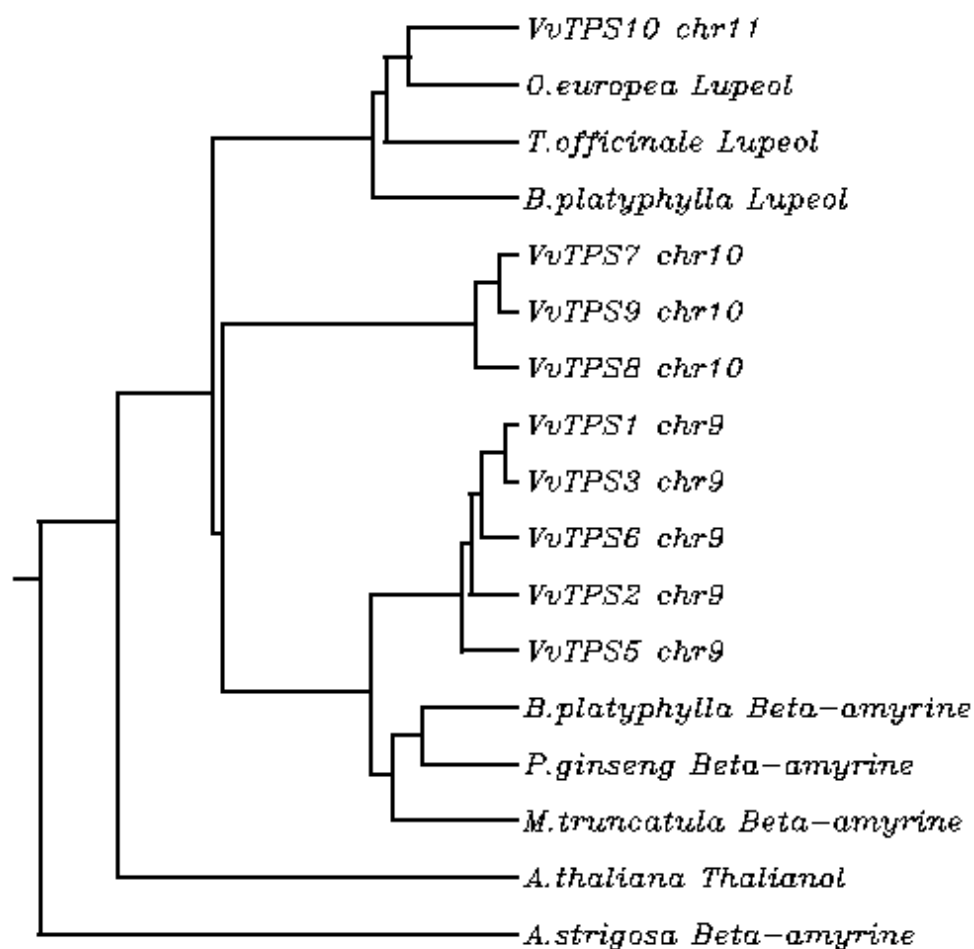


Figure 42 : Arbre phylogénétique des VvTPS et d'OSCs caractérisées chez d'autres plantes, réalisé par le logiciel clustalW. La longueur des branches est proportionnelle au pourcentage de similarité

protostéryl mène à la formation de stérols tels que le cycloarténol ou le lanostérol et donc à la formation de stéroïdes, d'autre part, le cation dammarényl peut être transformé pour aboutir aux triterpènes pentacycliques (**Figure 27**). Dans notre étude, nous nous intéressons aux OSCs impliquées dans la transformation du cation dammarényl. Afin de pouvoir proposer des hypothèses quant aux produits formés par les VvTPS candidates chez la vigne, nous avons comparé leur séquence protéique à celle d'autres TPS utilisant le cation dammarényl caractérisées chez d'autres plantes et regroupées dans la revue écrite par Phillips et al. (2006).

Un arbre phylogénétique a donc été réalisé par le logiciel ClustalW à partir de nos séquences protéiques d'intérêt et des séquences de TPS identifiées chez d'autres plantes (**Figure 42**). Cet arbre permet de comparer nos séquences de VvTPS entre elles de façon plus robuste que si l'on réalisait un arbre à partir des VvTPS uniquement. Il apparaît très clairement que les gènes de vigne localisés sur un même chromosome partagent des similarités plus fortes entre eux qu'avec les gènes situés sur les autres chromosomes, ils sont organisés par cluster spécifique à chaque chromosome. Au sein du chromosome 9, VvTPS5 est la protéine dont la séquence diffère le plus des autres, et VvTPS1 et VvTPS3 ont des séquences présentant un très fort pourcentage de similarité de 98%.

L'arbre phylogénétique (**Figure 42**) montre également que les VvTPS codées par les gènes localisés sur le chromosome 9 se trouvent dans le même cluster que des β -amyrine synthases caractérisées chez *Betula platyphylla*, *Panax ginseng* et *Medicago truncatula*. Les VvTPS codées par les gènes localisés sur le chromosome 10 sont présentes dans un même cluster que les enzymes précédemment décrites mais dont l'homologie de séquence est moindre. La β -amyrine synthase caractérisée chez *Avena strigosa* est très différente des autres TPS et n'appartient à aucun cluster sur notre arbre ; il semble que les TPS aient des origines différentes chez les monocotylédones et les dicotylédones (Qi et al. 2004). De façon surprenante, VvTPS10 fait partie du même groupe que des lupéol synthases caractérisées chez *Olea europea*, *Taraxacum officinale* et *Betula platyphylla* (**Figure 42**). Ces enzymes caractérisées forment un clade distinct des autres et leurs séquences sont de 74 à 81% identiques (Phillips et al. 2006).

Ces résultats sont à prendre avec précaution, car bien que les enzymes présentées dans cet arbre ne synthétisent qu'un seul composé, certaines TPS sont multifonctionnelles. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, une TPS a été caractérisée comme étant capable de produire du lupéol, de la β -amyrine, du germanicol et du taraxastérol (Segura, Meyer, et Matsuda 2000). Il est donc possible que nos VvTPS soient capables de catalyser la synthèse de plusieurs triterpènes. De plus, les similarités de séquence, même si elles donnent quelques indications, n'assurent pas que les enzymes présentes dans le même cluster produisent le même composé. Si les zones non conservées se situent au niveau

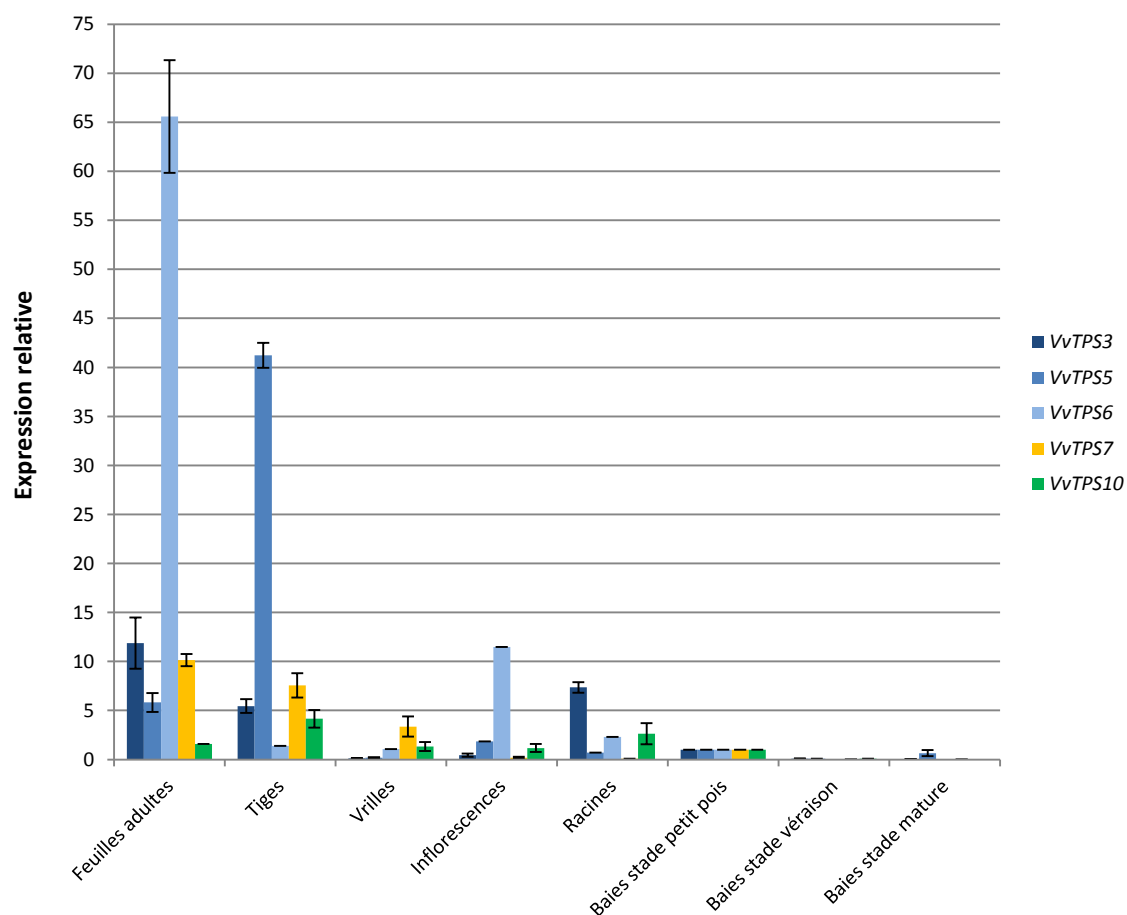


Figure 43 : Evaluation de l'expression des *VvTPS* dans différents organes de PN40024 en pot. L'expression des *VvTPS* a été évaluée en normalisant chaque échantillon par rapport aux baies au stade petit pois et par rapport à l'expression des gènes de référence Actine et EF1 α . Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

du site actif, le triterpène formé pourrait être différent. Le meilleur moyen de connaître le produit de l'activité de ces TPS est le clonage de ces gènes et leur expression dans des bactéries ou des levures afin de faire produire les composés par ces organismes. L'identification peut ensuite être réalisée par des méthodes classiques en chimie analytique telles que la GC-MS en comparant le composé analysé à différentes molécules témoin. Ces travaux sont en cours de réalisation en collaboration avec le Dr Marc Fischer de l'INRA de Colmar.

3. Expression des gènes codant des triterpène synthases candidates chez la vigne

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'expression de ces *VvTPS* dans différents organes de vigne et sous différentes conditions biotiques et abiotiques. Pour cela, des amorces spécifiques à chaque *VvTPS* ont été dessinées au niveau de la séquence codante (**Annexe 2**). Seules des amorces spécifiques ont pu être dessinées pour *VvTPS3*, 5, 6, 7 et 10. Le gène *VvTPS8* n'a pas pu être amplifié de façon spécifique. De plus, les gènes *VvTPS1* et *VvTPS2* ne semblent pas exprimés dans nos conditions puisqu'il est possible d'amplifier un fragment avec une matrice d'ADN génomique mais pas d'ADN complémentaire. Afin d'amplifier des zones spécifiques, certaines amorces ont été dessinées dans les zones transcrites mais non traduites 3'UTR (UnTranslated Region), cela a été le cas pour les gènes *VvTPS5*, 6 et 7 (**Annexe 1**). L'expression de l'ensemble des gènes retenus n'a donc pas pu être évaluée, mais les *VvTPS3*, 5, 6, 7 et 10 semblent représenter la diversité des gènes candidats identifiés chez la vigne puisque les séquences situées sur les trois chromosomes sont représentées.

3.1 Comparaison de l'expression des *VvTPS* dans différents organes

La phase suivante de l'étude des *VvTPS* candidats chez la vigne a été d'étudier leur expression dans les différents organes afin de déterminer quel organe était susceptible de produire des triterpènes libres ou des saponines en plus grandes quantités.

L'étude a été réalisée sur plantes en pots, le clone utilisé était le Pinot noir PN40024 dont le génome est entièrement séquencé. L'expression relative de nos gènes d'intérêt a été normalisée par rapport à l'expression dans les baies au stade petit pois, organes ayant une expression détectable, mais la plus faible de l'ensemble des *VvTPS*, ce qui permet une meilleure comparaison avec les autres organes (**Figure 43**). L'expression des *VvTPS* est globalement plus forte dans les tiges et les feuilles.

Tableau 4 : Analyse transcriptomique des gènes étudiés chez différents organes, d'après les travaux de Fasoli et al. (2012). Les cases noires correspondent au niveau caractérisé comme « exprimé » de chacun des gènes

N° TPS	Feuilles	Tiges	Vrilles	Inflorescences	Racines	Baie stade petit pois
1						
2						
3 (et 4)						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

VvTPS6 dans les feuilles et *VvTPS5* dans les tiges sont particulièrement plus exprimés, respectivement 65 et 40 fois plus que dans les baies au stade petit pois. Dans les vrilles, les inflorescences et les racines, l'ensemble des gènes est plus faiblement exprimé, de la même manière que dans les baies à tous les stades de développement (**Figure 43**).

Dans leur étude sur l'expression d'un ensemble de plus de 27000 gènes dans 54 échantillons représentatifs des différents organes de la vigne au cours de la maturation, Fasoli et al. (2012) ont réalisé, via une puce à ADN, un atlas du transcriptome de la vigne (cépage Corvina). Il nous a semblé intéressant de comparer leurs résultats avec les nôtres (**Tableau 4**). Au niveau des tiges, les résultats sont à l'opposé de ce que nous avons obtenu, puisque d'après leur étude, Fasoli et al. (2012) montrent que l'ensemble des gènes est exprimé, sauf *VvTPS5* et *VvTPS10*. Pour les vrilles, les inflorescences et les baies, il y a effectivement une expression faible de l'ensemble des *VvTPS*. Dans les racines, seul *VvTPS10* est exprimé, tandis que dans notre étude nous montrons que *VvTPS3* l'est aussi. Les différences notées entre nos deux études peuvent s'expliquer par la méthode utilisée pour évaluer l'expression des gènes. La présence de transcrits détectée par les puces à ADN permet d'obtenir une donnée d'expression brute tandis que les analyses par qPCR résultent en une expression relative. De plus, la méthode de la puce à ADN, même si elle permet d'obtenir une masse de données très importante, peut aussi être source d'erreur, les sondes utilisées sont-elles réellement spécifiques des gènes à analyser ? Par la méthode de la qPCR, nous pouvons vérifier cela par le séquençage des produits amplifiés. En outre, le choix du cépage est différent du nôtre, il se peut que l'expression de nos gènes d'intérêt dans les différents organes de la vigne soit dépendante du cépage.

3.2 Comparaison de l'expression des *VvTPS* dans les feuilles de différents cépages

Les feuilles semblent donc être un organe de la vigne dans lequel les *VvTPS* sont plus exprimées que dans les autres organes. Afin de comprendre la régulation de l'expression des *VvTPS* et de la comparer aux teneurs en triterpènes libres quantifiées au chapitre 1, nous avons étudié l'expression des *VvTPS* chez 8 cépages. Pour cela, des feuilles adultes de Muscat, Riesling, Chasselas, Sylvaner, Gewurztraminer, Pinot gris, Pinot noir et Pinot auxerrois ont été prélevées au vignoble. Après extraction d'ARN, l'expression des *VvTPS* a été évaluée par PCR quantitative en temps réel. Les produits de qPCR ont tout d'abord été séquencés pour déterminer si les fragments amplifiés présentaient du polymorphisme chez les différents cépages. Les résultats obtenus montrent que les

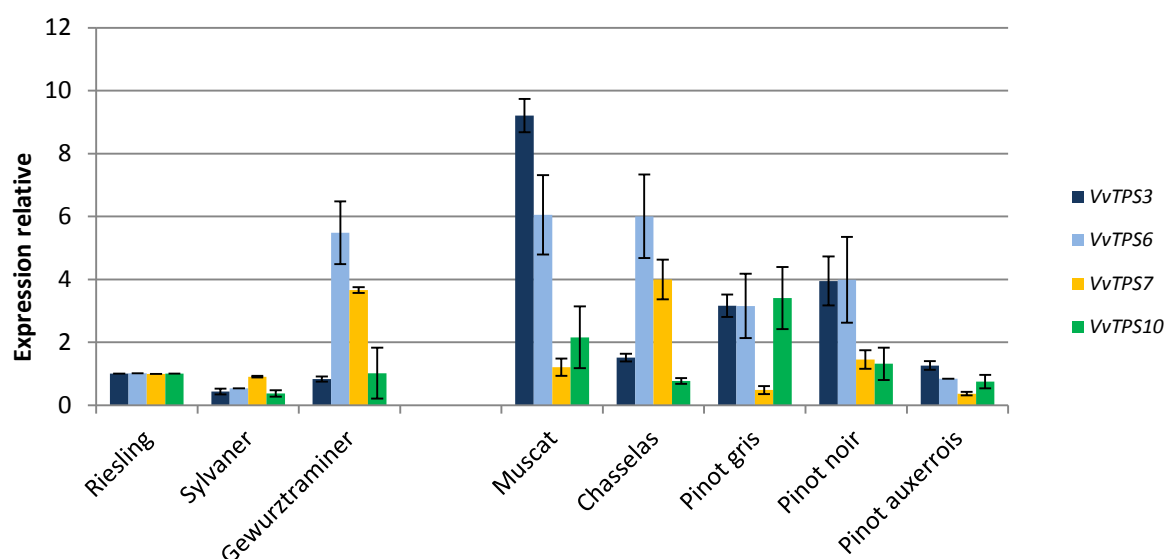
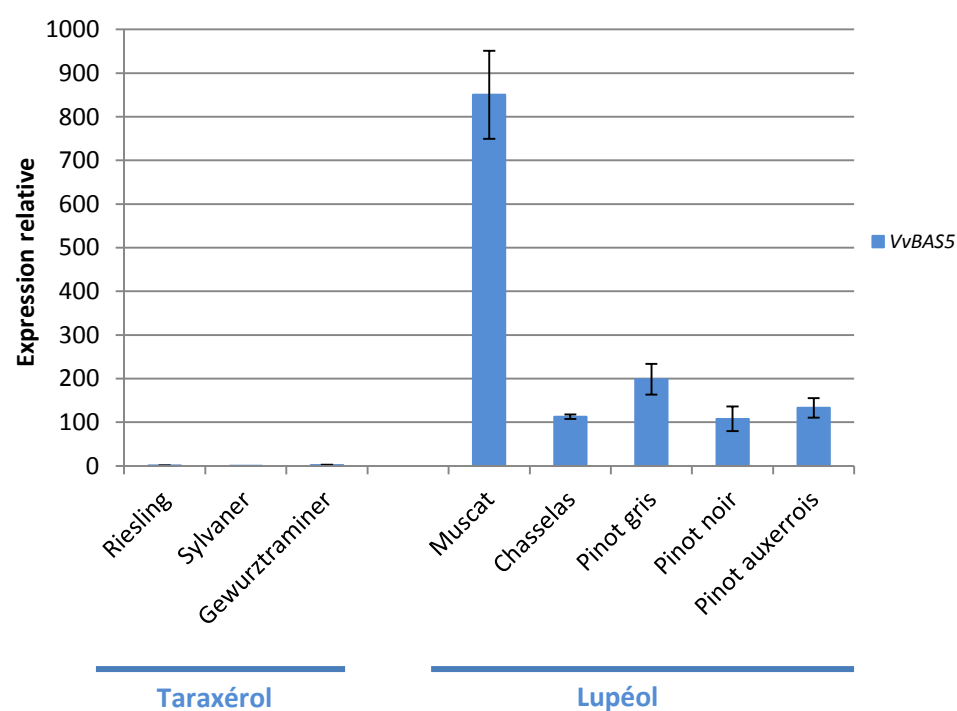
A**B**

Figure 44 : Evaluation de l'expression des *VvTPS* dans les feuilles de différents cépages prélevées au vignoble. L'expression des *VvTPS* a été évaluée en normalisant chaque échantillon par rapport au Riesling et par rapport à l'expression des gènes de référence Actine et EF1 α . **A** : expression des gènes *VvTPS*3, 6, 7 et 10. **B** : expression de *VvTPS*5. Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions. Le composé majoritairement retrouvé à la surface des feuilles du cépage est également indiqué.

séquences amplifiées sont identiques chez tous les cépages étudiés et correspondent bien au gène ciblé.

Dans un premier temps, l'expression des *VvTPS* chez les différents cépages a été évaluée en la normalisant par rapport à l'expression chez le Riesling, cépage chez lequel l'expression des *VvTPS* était la plus faible. Afin de comparer nos résultats à la quantification des triterpènes à la surface des feuilles dans le chapitre I des résultats, nous avons placé sur les **figures 44 A et B** à gauche les cépages produisant principalement du taraxérol et à droite les cépages produisant principalement du lupéol. L'analyse de l'expression des gènes *VvTPS* 6, 7 et 10 ne montre pas de différence significative entre les deux groupes de cépages (**Figure 44 A**). Cependant, de façon très notable, l'expression de *VvTPS5* se révèle être forte dans les cépages producteurs de lupéol et très faible dans les cépages producteurs de taraxérol. Cette tendance se retrouve dans une moindre mesure pour la *TPS3*. (**Figure 44A et B**).

Ces résultats devront être confirmés par la caractérisation des enzymes *TPS3* et 5, via une expression hétérologue dans la levure. Si ces enzymes catalysent la synthèse de lupéol, l'expression des *VvTPS3* et *VvTPS5* expliqueraient la production différentielle de lupéol chez nos cépages alsaciens.

3.3 Effet de stress biotiques et abiotiques sur l'expression de gènes codant des triterpène synthases candidates

3.3.1 Effet d'un stress biotique sur l'expression des *VvTPS*

Afin de déterminer si l'expression de nos gènes d'intérêt est activée lors d'infections, différents pathosystèmes ont été mis en place, le matériel végétal utilisé était le clone issu de Pinot noir dont le génome est entièrement séquencé : PN40024.

D'une part, des infections ont été réalisées directement sur vitroplants, des gouttes de solution de spores de la souche B0510 de *Botrytis cinerea* ont été déposées directement sur les feuilles du vitroplant et les feuilles ont ensuite été récoltées toutes les 24 h pendant 96 h afin de suivre la cinétique de l'infection. A 48 h, il était possible d'observer des nécroses et symptômes de macération à la surface des feuilles. Le suivi de cette cinétique par qPCR n'a montré aucune activation de l'expression des *VvTPS*. Il semble donc que l'expression des *VvTPS* ne soit pas activée par une infection par *B. cinerea*.

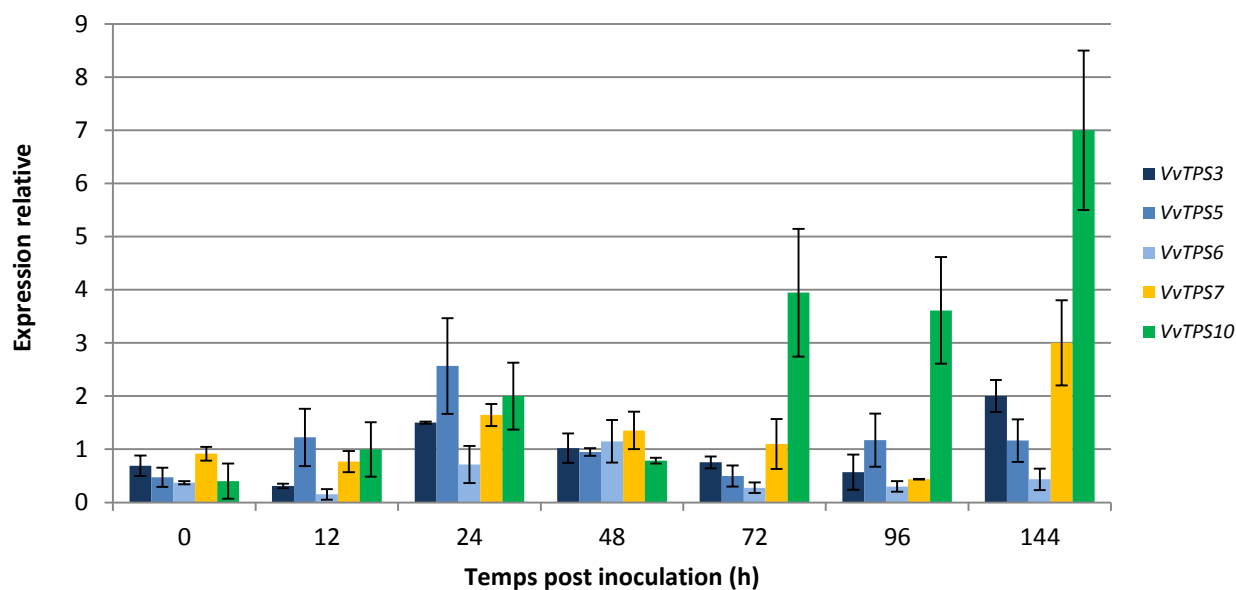


Figure 45 : Evaluation de l'expression des *VvTPS* en réponse à un stress biotique, infection de disques foliaires par *Plasmopara viticola*. Chaque point correspond à la durée post infection. L'expression des *VvTPS* a été évaluée en normalisant chaque échantillon par rapport au témoin traité à l'eau et prélevé après la même durée et par rapport à l'expression des gènes de référence Actine et EF1 α . Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

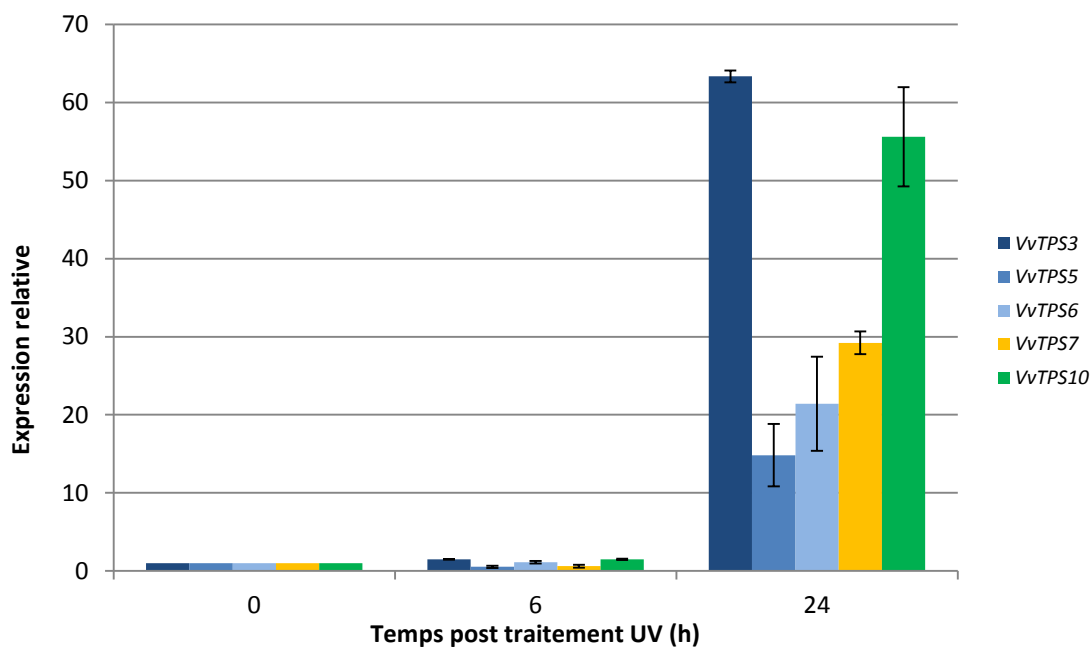


Figure 46 : Evaluation de l'expression des *VvTPS* en réponse à un stress abiotique, l'application d'UV durant 5 minutes. Chaque point correspond à la durée post traitement. L'expression des *VvTPS* a été évaluée en normalisant chaque échantillon par rapport au témoin à T₀ et par rapport à l'expression des gènes de référence Actine et EF1 α . Les données ont été obtenues à partir de 3 répétitions

D'autre part, des infections ont été réalisées sur disques foliaires. Le premier test a été réalisé avec *Erysiphe necator*. Les prélèvements sont arrêtés après l'apparition de la sporulation à la surface des feuilles. De la même manière que pour le premier test, l'expression des *VvTPS* n'est pas activée en réponse à une infection par *E. necator* en comparaison avec le témoin. Un deuxième test sur disque foliaire a été réalisé avec *Plasmopara viticola*, agent du mildiou (**Figure 45**). Les prélèvements ont été réalisés jusqu'à 144 h après infection, temps à partir duquel la sporulation était observable à la surface des feuilles. D'après cette cinétique, *VvTPS10* semble être le seul gène surexprimé à partir de 72 h après l'infection. Cependant, ces résultats sont à nuancer vu la variabilité des niveaux d'expression, ceux-ci étant peu élevés en comparaison avec des gènes de défense connus chez la vigne (travaux du laboratoire). L'activation de l'expression de *VvTPS10* a été ici testée dans le cas d'une interaction vigne-mildiou compatible, il serait intéressant de tester celle-ci dans le cas d'une interaction incompatible (par exemple avec *Vitis riparia*).

Les saponines sont classifiées parmi les phytoanticipines, molécules préformées dans les plantes. D'après nos tests d'infection par différents bioagresseurs, il semble donc que la synthèse de la génine soit réalisée de façon continue chez la plante, les infections n'induisent pas la synthèse de tels composés dans les feuilles. Le niveau basal de défense conféré par la présence de triterpènes pourrait cependant permettre à la plante de combattre plus facilement les infections contre certains bioagresseurs.

3.3.2 Effet d'un stress abiotique sur l'expression des *VvTPS*

L'expression des *VvTPS* ne semblant pas être induite par des infections, nous avons décidé de tester si un stress d'origine abiotique pouvait avoir une influence sur l'expression de ces gènes. Le stress choisi a été le traitement d'une plante en pot sous une lampe UV pendant 5 minutes. Des feuilles ont ensuite été prélevées à 6 et 24 h après traitement, et les niveaux d'expression des *VvTPS* ont été évalués par qPCR (**Figure 46**). Lorsque les feuilles ont été récoltées 6 h après traitement, aucune induction de l'expression des gènes n'a été notée. Le stress aux UV n'entraînerait donc pas d'augmentation de l'expression des *VvTPS* de façon très précoce. Cependant, 24 h après traitement aux UV, l'expression de l'ensemble des gènes étudiés est activée. Les gènes *VvTPS3* et *VvTPS10* ont les expressions relatives les plus fortes, 63 et 55 fois plus que le témoin respectivement; *VvTPS5*, *VvTPS6*, et *VvTPS7* sont surexprimés 15, 21 et 29 fois respectivement par rapport au témoin.

Contrairement à ces observations, un stress aux UV chez le soja n'induit pas de surexpression d'un gène codant une TPS (Chung et al. 2007), cependant la publication n'indique pas de quelle manière

ce stress a été appliqué, la durée d'exposition était peut-être plus faible. L'effet de différents stress sur la voie de biosynthèse des terpènes a également été étudié chez la vigne (Gil et al. 2012) et l'application d'un stress aux UV (16 h de traitement UV d'indice faible) est corrélée avec une augmentation des taux de lupéol dans les feuilles (cultivar Malbec). L'augmentation de ces taux en 16 h suggère que ces composés ne sont pas synthétisés *de novo*. Il a été montré que le lupéol est capable d'intercepter les radicaux libres (Nagaraj, Sunitha, et Varalakshmi 2000), il serait donc capable de protéger la plante contre les dommages photo-oxydatifs générés par les UV d'indice faible (Gil et al. 2012). D'après ce constat, il pourrait être intéressant de tester la sensibilité aux UVs des cépages ayant une production différentielle de lupéol (**figure 37**).

***Chapitre 3 :
Utilisation des
saponines pour lutter
contre des agents
pathogènes de la
vigne***

1. Introduction

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1 de l'introduction bibliographique, la vigne est une espèce soumise à de nombreuses pressions parasitaires. Un grand nombre de maladies affectant la vigne peuvent être contrôlées par des traitements phytosanitaires, mais la toxicité des produits utilisés contre la maladie du court-noué et des maladies du bois ont entraîné leur retrait du marché. Aujourd'hui, aucun moyen de lutte par traitement n'est disponible pour lutter contre ces maladies.

Les plantes sont capables de produire des phytoanticipines, molécules préformées et à activité biocide. C'est le cas des saponines dont la présence est un critère déterminant dans la résistance de certaines plantes aux bioagresseurs (Papadopoulou et al. 1999). Nous nous sommes donc intéressés à ces molécules, triterpénoïdes retrouvés chez un grand nombre de plantes afin de déterminer si elles pouvaient avoir un rôle dans la protection de la vigne face aux agents pathogènes contre lesquels aucun traitement n'est disponible.

Les saponines peuvent être extraites de différentes plantes. L'écorce du quillaja, par exemple est très riche en saponines et il est possible de s'en procurer dans le commerce. Des saponines peuvent également être facilement extraites des racines de la gypsophile. Nous avons donc testé l'effet d'une gamme de concentrations en ces saponines sur la croissance du mycelium de différentes souches de champignon d'une part et sur la mortalité des nématodes d'autre part.

2. Utilisation de saponines pour lutter contre des agents pathogènes fongiques de la vigne

2.1 Test d'efficacité des saponines contre *Botrytis cinerea*

Un travail préliminaire avait déjà été entamé lors de mon arrivée au laboratoire concernant l'effet de saponines extraites de l'arbre du Chili *Quillaja saponaria* sur différents organismes présents dans l'environnement de la vigne : *Botrytis cinerea*, champignon pathogène agent de la pourriture grise ; *Xiphinema index*, nématode impliqué dans la vection du GFLV et une collection de levures dont certaines étaient endémiques de la vigne. Je me suis chargée de tester *in vitro* l'impact de ces saponines sur la croissance du mycélium et la germination de différentes souches de *B. cinerea*.

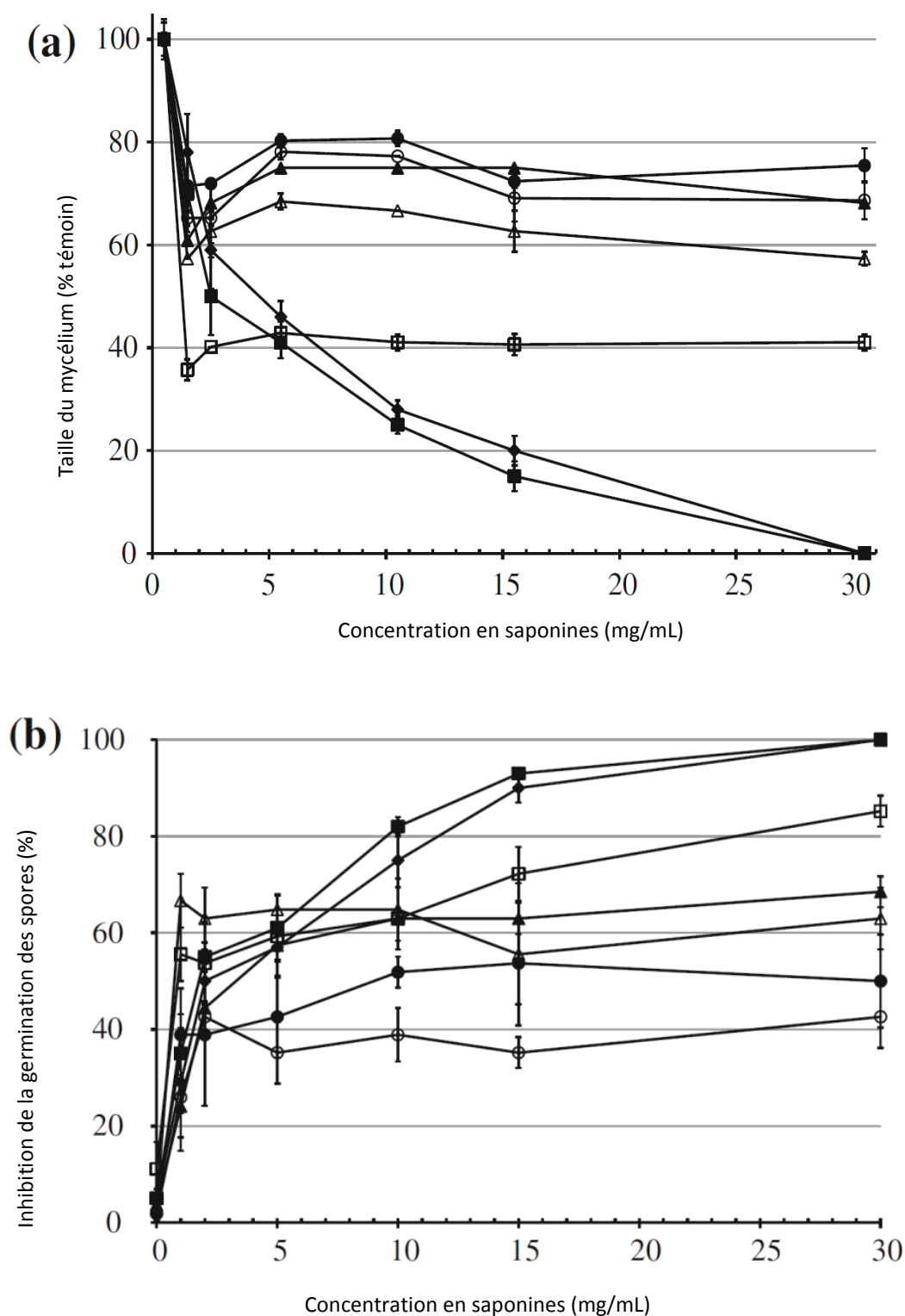


Figure 47: Effet de la concentration en saponines issues de *Q. saponaria* sur la taille du mycélium (a) et l'inhibition de la germination des spores (b) de différentes souches de *B. cinerea*, 4 jours après application. Les données ont été obtenues d'après 2 répétitions conduites en triplicat.

♦ : T4 ; ■ : B05.10 ; ▲ : bc704 ; △ : bc651 ; □ : bc1740 ; ● : bc32 ; ○ : bc1510

Ces recherches ont fait l'objet d'une publication:

Fischer, M., Pensec, F., Demangeat, G., Farine, S., Chong, J., Ramirez-Suero, M., Mazet, F. and Bertsch, C., (2011). Impact of *Quillaja saponaria* saponins on grapevine ecosystem organisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**, 197–206

Pour ce travail, différentes souches de *B. cinerea* ont été choisies : 2 souches de référence et 4 souches isolées au vignoble. Les souches de référence sont T4 isolée de la tomate et B05.10 isolée de la vigne. Les souches bc704 et bc651 ont été isolées en Champagne et provoquent de la pourriture grise, la souche bc32 isolée dans le bordelais est responsable de la pourriture grise sur baies et les souches bc1740 et bc1510 ont été isolées dans la région de Bordeaux et provoquent de la pourriture noble. Ces souches ont été mises en contact avec des milieux enrichis en saponines à différentes concentrations et la taille du mycélium a été relevée 4 jours après mise en contact.

Sur *B. cinerea*, ces travaux montrent qu'une concentration en saponines de 30 mg/mL est capable d'inhiber totalement la croissance du mycélium des souches de référence T4 et B05.10 (**Figure 47 a**). Cependant, pour les autres souches, l'effet des saponines sur la croissance du mycélium est maximal à 1 mg/mL, puis l'effet est stabilisé jusqu'à des concentrations de 30 mg/mL. Ce plateau est retrouvé chez toutes les souches non référencées, mais l'efficacité des saponines est plus ou moins importante selon la souche. L'isolat bc1740 semble avoir un niveau de sensibilité aux saponines intermédiaire entre les souches de référence et les autres. Pour des concentrations supérieures ou égales à 1 mg/mL, la taille du mycélium atteint 40 à 45% de la taille du témoin sans saponines. Les souches bc704, bc32 et bc1510 ont un comportement similaire, elles sont relativement peu sensibles aux saponines puisque la taille de leur mycélium correspond à 70-80% de celle du témoin à partir d'une concentration de 1 mg/mL. Pour des concentrations supérieures à 1 mg/mL, la taille du mycélium de la souche bc651 atteint 60 à 65% de la taille du témoin sans traitement.

En ce qui concerne l'action des saponines sur la germination des spores de *B. cinerea* (**Figure 47 b**), les souches de référence sont totalement inhibées par une concentration de 30 mg/mL. Les spores des souches bc1510, bc32, bc651 et bc704 sont sensibles de la même manière que le mycelium aux saponines : la germination des spores diminue avec la concentration en saponines jusqu'à 1 mg/mL, puis l'effet est stabilisé jusqu'à 30 mg/mL avec respectivement, 42, 49, 62 et 70% d'inhibition de la germination. Les spores de la souche bc1740 sont également les plus sensibles aux saponines, et cette fois ci l'inhibition de la germination augmente avec la concentration, jusqu'à 85% d'inhibition de la germination à 30 mg/mL.

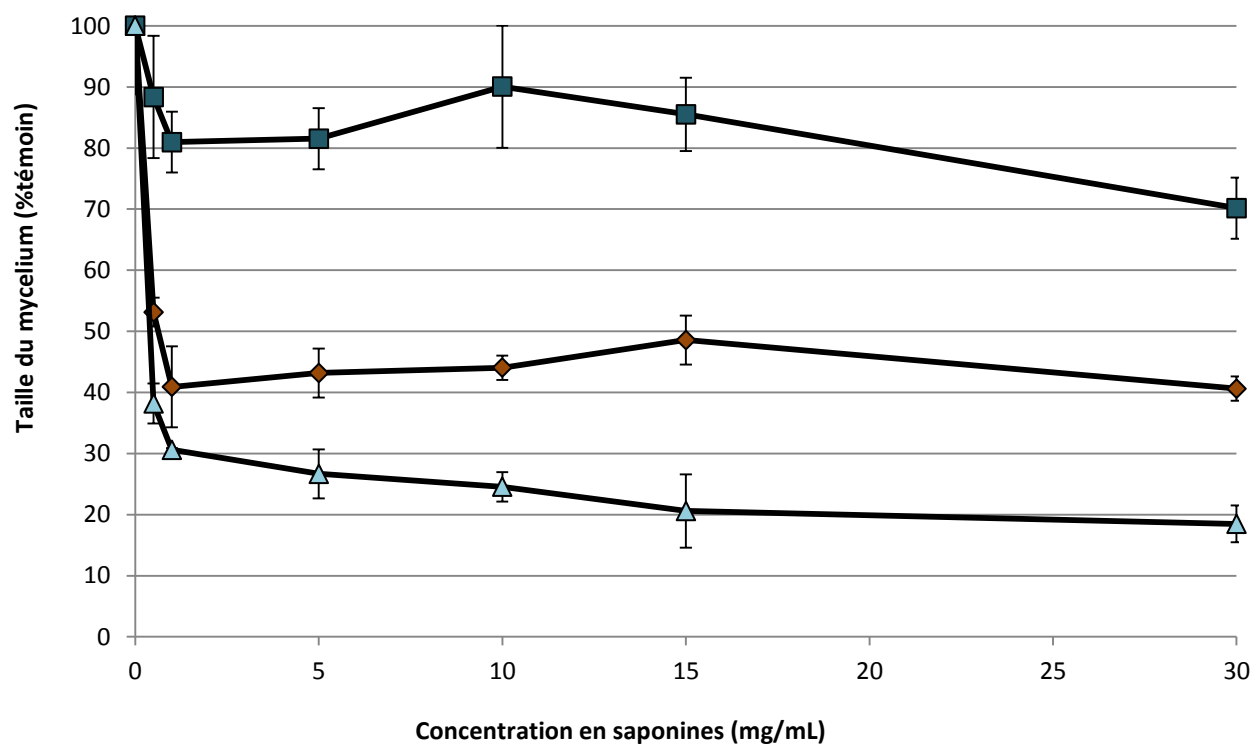


Figure 48 : Effet de la concentration en saponines issues de *Q. saponaria* sur la croissance de trois souches de champignons associés au BDA. Les données ont été obtenues d'après 2 répétitions conduites en triplicat.

■ : *N. parvum* Bourgogne (7 jours post traitement) ; ▲ : *N. parvum* Sainte Victoire (4 jours post traitement) et ♦ : *D. seriata* 98.1 (3 jours post traitement)

L'action d'un traitement à base de saponines sur la croissance du mycelium des champignons peut être assimilée à celle d'un traitement fongistatique, puisqu'il limite la croissance sans tuer le champignon. Les souches de référence sont donc plus sensibles à un traitement à base de saponines que les souches isolées au vignoble. Il faut cependant noter que pour obtenir un effet maximal sur ces souches de référence, les concentrations en saponines testées sont élevées. Chez les souches isolées au vignoble, il n'y a pas de lien entre leur sensibilité aux saponines et le fait qu'elles provoquent de la pourriture grise ou de la pourriture noble ou leur origine géographique. De plus, il semble qu'à partir d'une certaine concentration en saponines, les souches non référencées soient capables d'activer un mécanisme de contournement de la toxicité des saponines. De cette manière, à partir d'un certain seuil, il n'y a plus d'effet dose. Afin d'étudier dans le détail la sensibilité différentielle des souches face à un traitement à base de saponines, il pourrait être intéressant de réaliser ce test sur un nombre plus important de souches isolées au vignoble.

Un traitement à base de saponines semble donc permettre de limiter le développement de *B. cinerea*, et donc de retarder l'apparition des symptômes.

2.2 Test d'efficacité des saponines contre différents agents fongiques associés aux maladies du bois

2.2.1 Efficacité des saponines issues de *Quillaja saponaria* sur des champignons associés aux maladies du bois

L'effet des saponines de *Q. saponaria* a été testé sur deux espèces de champignons appartenant à la famille des Botryosphaeriaceae associées au BDA chez la vigne : *Diplodia seriata* et *Neofusicoccum parvum*. Les tests ont été réalisés *in vitro* avec les mêmes concentrations que celles utilisées pour le test sur *B. cinerea*. Les souches choisies étaient des isolats de référence étudiés au laboratoire : *D. seriata* 98.1, *N. parvum* Bourgogne et *N. parvum* Sainte Victoire. La date à laquelle la taille du mycélium a été retenue correspond à la veille de la saturation des boîtes chez les témoins. Ainsi, la date de relevé de la taille du mycélium pour *D. seriata* 98.1, *N. parvum* Bourgogne et *N. parvum* Sainte Victoire est de respectivement 3, 7 et 4 jours après la mise en culture.

L'effet des saponines sur *D. seriata* 98.1 est maximal pour une concentration de 1 mg/mL, la taille du mycelium n'atteint que 40% de la taille du témoin (**Figure 48**), et se stabilise ensuite jusqu'à une concentration de 30 mg/mL. La taille du mycélium de *N. parvum* Sainte Victoire diminue fortement par rapport au témoin sous l'action de la concentration 0,5 mg/mL, qui ne lui permet que d'atteindre

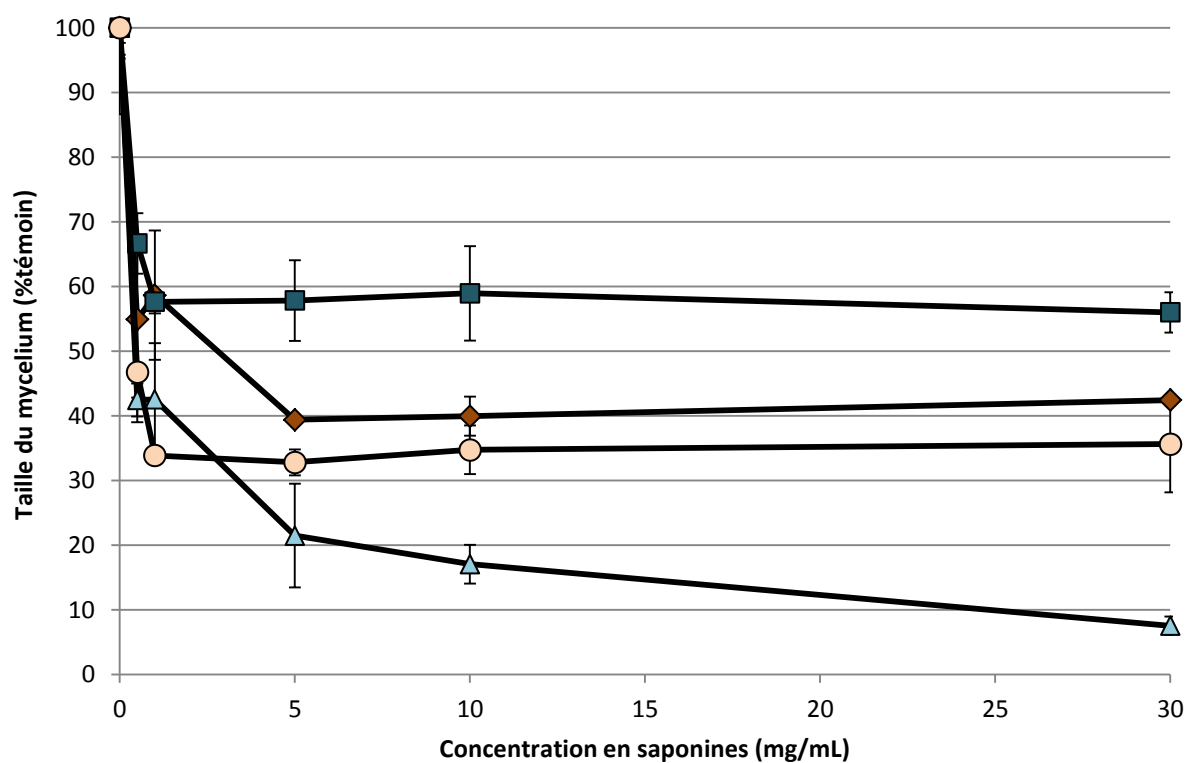


Figure 49 : Effet de la concentration en saponines issues de *Q. saponaria* sur la croissance de quatre souches de champignons associés au BDA. Les données ont été obtenues d'après 2 répétitions conduites en triplicat.

■ : *N. parvum* Bourgogne (7 jours post traitement); ▲ : *N. parvum* Sainte Victoire (4 jours post traitement); ◆ : *D. seriata* 98.1 (4 jours post traitement) et ● : *D. seriata* 99.7 (3 jours post traitement)

37% de la taille du mycelium du témoin (**Figure 48**). Puis, l'augmentation de la concentration en saponines jusqu'à 30 mg/mL permet de réduire la croissance de son mycélium, concentration pour laquelle le mycelium atteint 18% de la taille du témoin. *N. parvum* Bourgogne semble moins sensible aux saponines issues de *Q. saponaria*, puisqu'il n'est pas observé de différence significative de la taille du mycélium jusqu'à des concentrations de 15 mg/mL (**Figure 48**). Seule la concentration 30 mg/mL entraîne une réduction significative de la croissance: 70% de la taille du mycelium du témoin.

Les saponines issues du quillaja ont une concentration inhibitrice à 50% (CI50) de 0,6 mg/mL et de 0,4 mg/mL sur *D. seriata* 98.1 et *N. parvum* Sainte Victoire respectivement. La souche *N. parvum* Bourgogne est beaucoup moins sensible aux saponines puisqu'elle n'atteint pas ce seuil de 50% avec les concentrations testées.

2.2.2 Efficacité des saponines issues de *Gypsophila paniculata* sur des champignons associés aux maladies du bois

Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Max Henry de l'Université de Nancy, j'ai également été amenée à utiliser un extrait de saponines issues de la gypsophile, *Gypsophila paniculata*. Ces saponines peuvent être facilement extraites des racines de la gypsophile, plante pouvant être cultivée sous nos climats et donc plus facile à se procurer que le quillaja. Le même test que celui effectué avec les saponines issues de *Q. saponaria* a été réalisé. Pour cette analyse, nous avons ajouté une souche supplémentaire, *D. seriata* 99.7.

Les concentrations inférieures ou égales à 1 mg/mL entraînent une diminution de la taille du mycélium des souches *N. parvum* Bourgogne et *D. seriata* 99.7 (**Figure 49**), puis la croissance stagne jusqu'à une concentration de 30 mg/mL, la taille du mycelium de ces souches atteint respectivement 57 et 35% de la taille des témoins. L'augmentation de la concentration jusqu'à 5 mg/mL permet de diminuer la croissance de *D. seriata* 98.1, la taille du mycelium atteint 40% de la taille du témoin. A partir de la dose 5 mg/ml, l'augmentation de la concentration en saponines jusqu'à 30 mg/mL n'entraîne pas de réduction de croissance du mycelium. Enfin, la croissance de la souche *N. parvum* Sainte Victoire diminue fortement jusqu'à une concentration de 5 mg/mL où elle atteint 22% de la taille du témoin, puis diminue moins fortement jusqu'à la concentration 30mg/mL qui permet d'atteindre 8% de la taille du témoin sans traitement (**Figure 49**).

La CI50 des saponines issues de la gypsophile sur *D. seriata* 99.7 et *N. parvum* Sainte Victoire est de 0,4 mg/mL, tandis qu'elle est de 3 mg/mL sur *D. seriata* 98.1 et qu'elle n'est pas atteinte avec *N. parvum* Bourgogne.

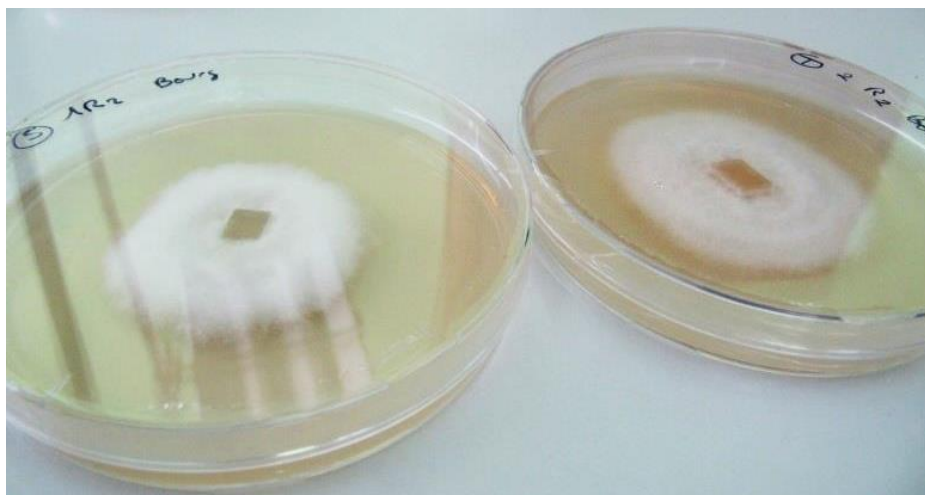


Figure 50 : *Neofusicoccum parvum* Bourgogne soumis à des concentrations en saponines de 5 mg/mL (à gauche) et de 0 mg/mL (à droite), 6 jours mise en culture

Tableau 5 : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium des champignons étudiés, le jour avant saturation de la boîte, en fonction des saponines utilisées avec une concentration de 30mg/mL

	<i>N. parvum</i> Bourgogne	<i>N. parvum</i> Sainte Victoire	<i>D. seriata</i> 98.1
Saponines issues de <i>Q. saponaria</i>	31 %	82 %	60 %
Saponines issues de <i>G.paniculata</i>	44 %	92 %	57 %

L'effet du traitement à base de saponines de la gypsophile est fongistatique, comme ce qui a été observé avec les saponines du quillaja. On peut remarquer qu'il n'y a pas de lien entre le genre du champignon testé et sa sensibilité aux saponines. L'espèce *D. seriata* a un niveau de sensibilité intermédiaire entre les deux souches de l'espèce *N. parvum*. Avec la plus forte concentration en saponines, le développement de la souche *N. parvum* Sainte Victoire est presque totalement inhibé, les saponines fortement concentrées pourraient donc être un bon moyen de lutte contre cette souche. Comme cela a été observé avec les saponines du quillaja, la souche Bourgogne semble moins sensible aux saponines de *G. paniculata* que les autres souches. Phénotypiquement, nous avons observé des différences entre les souches mises en contact avec les saponines et celles qui ne l'ont pas été. Le mycélium de la souche Bourgogne se développe plus en hauteur sur les milieux enrichis en saponines (**Figure 50**). Cette réaction du champignon au traitement pourrait expliquer la sensibilité moindre par rapport aux autres souches. De plus, il a été noté que la souche Bourgogne est particulièrement agressive sur vigne (données du laboratoire).

2.2.3 Comparaison de l'efficacité des saponines issues de *Quillaja saponaria* et *Gypsophila paniculata* pour lutter contre des champignons des maladies du bois

Grâce à ces deux études, il est possible de comparer l'effet des saponines issues de *Q. saponaria* et de *G. paniculata* sur le développement de 3 souches de champignons impliqués dans les maladies du bois : *D. seriata* 98.1, *N. parvum* Bourgogne et *N. parvum* Sainte Victoire (**Tableau 5**). Les saponines issues de *G. paniculata* permettent d'obtenir des taux d'inhibition de la croissance du mycélium supérieurs à ceux obtenus avec *Q. saponaria*, de l'ordre de 10 points supplémentaires pour les deux souches de *N. parvum*. En revanche, l'effet sur *D. seriata* 98.1 est similaire avec les deux extraits de saponines. Il semble donc que l'effet antifongique des saponines soit dépendant de la souche mise en contact.

2.3 Détoxification des saponines par les agents fongiques

2.3.1 Identification d'une saponinase candidate chez les champignons d'intérêt associés aux maladies du bois

Afin de comprendre le mécanisme responsable de l'arrêt de l'effet dose de traitements à base de saponines de concentration supérieure à 1 mg/mL, nous avons supposé qu'à partir d'une certaine concentration, les souches de champignon étudiées étaient capables de contourner la toxicité des

saponines. Différents moyens de contournement présentés en partie 2.6.3.1.3 de l'introduction bibliographique expliqueraient la résistance de certains champignons à un traitement à base de saponines. Nous avons émis l'hypothèse que nos champignons d'intérêt seraient capables de produire une ou plusieurs enzymes capables d'hydrolyser les chaînes osidiques des saponines, des β -glucosidases, qui permettent de détoxifier la saponine. Ces enzymes sont appelées des saponinases.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons aligné des gènes codant des saponinases caractérisées chez 3 champignons afin de repérer des séquences conservées. L'agent pathogène *Gaeumannomyces graminis* produit une avénacinase caractérisée et dont le gène codant mesure 3480 pb, *Septoria lycopersici* est capable de synthétiser une tomatinase dont le gène possède 2400 pb et enfin, *Botrytis cinerea* produit également une avénacinase codée par un gène de 3560 pb. L'alignement de ces gènes, présenté en **annexe 3**, a permis de dessiner un couple d'amorces dégénérées qui amplifie un fragment de 250 pb chez la souche *D. seriata* 99.7, et présente des homologies avec des saponinases déjà caractérisées. En effet, le BlastX (permettant l'accès à la base de données sur les protéines à partir d'une séquence nucléotidique) sur NCBI (National Center for Biotechnology Information) montre que la séquence du fragment amplifié présente des homologies avec des séquences codant des enzymes appartenant à la superfamille GlycoHydro3, à laquelle appartiennent les saponinases produites par *G. graminis*, *S.lycopersici* et *B. cinerea*. Ce fragment présente également des homologies avec des gènes codant différentes β -glucosidases fongiques. La similarité de séquence la plus forte, 98%, est celle obtenue avec une « hypothetical protein BC1G_07110 » issue de la souche B05.10 de *B. cinerea*.

Les étapes suivantes de ce travail ont été de tenter d'identifier la séquence entière de ce gène. Ce travail a été réalisé via différentes techniques de la biologie moléculaire, la RACE-PCR et la PCR inverse ou iPCR. Ces deux méthodes ont permis d'obtenir un fragment de 1200 pb présentant également des homologies avec des gènes codant des enzymes appartenant à la superfamille GlycoHydro3, et également 98% d'identité avec l'« hypothetical protein BC1G_07110 ».

2.3.2 Etude de l'expression de la β -glucosidase candidate identifiée chez des souches de champignons mises en contact avec des saponines.

Nous avons ensuite décidé d'étudier l'expression de ce gène chez nos 4 souches mises en contact avec les saponines issues de *G. paniculata*. Du mycélium issu de chaque échantillon provenant du test d'impact des saponines sur la croissance des 4 souches impliquées dans les maladies du bois a

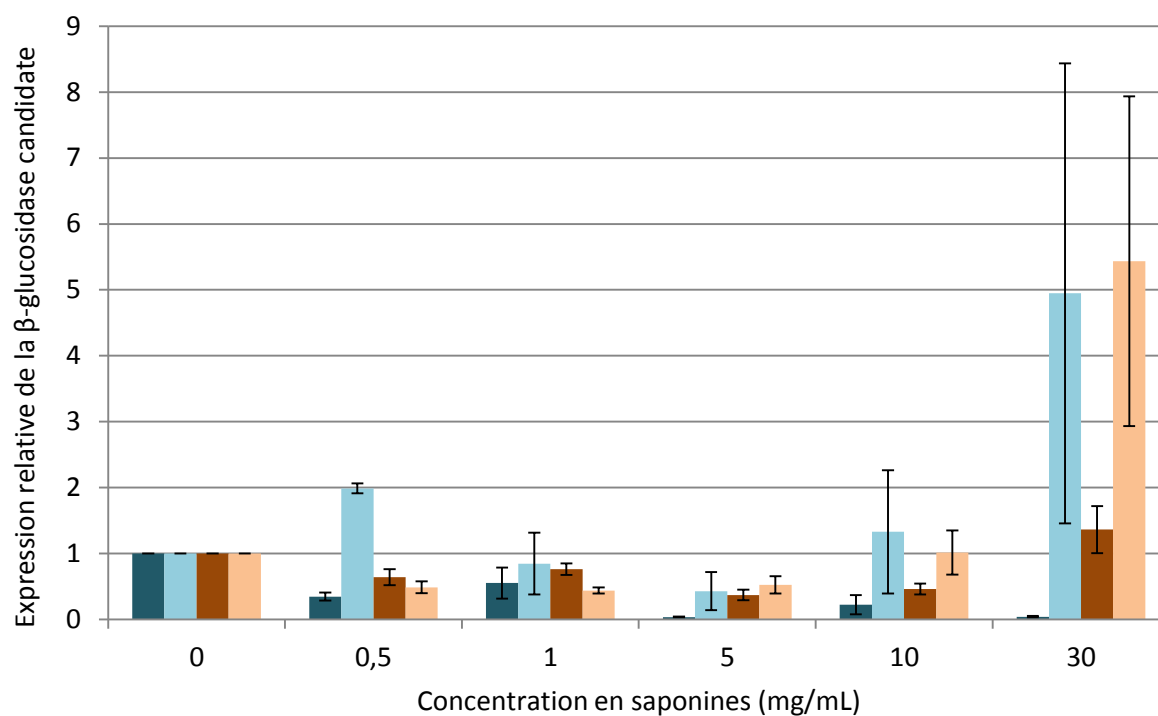


Figure 51 : Expression relative de la β -glucosidase candidate chez les 4 souches de champignon associés aux maladies du bois : ■ : *N. parvum* Bourgogne ; ■ : *N. parvum* Sainte Victoire ; ■ : *D. seriata* 98.1 ; ■ : *D. seriata* 99.7

L'expression de ce gène est définie par rapport à l'expression dans le témoin sans saponines et normalisée par rapport à l'expression de l'actine.

été prélevé. L'ARNm en a été extrait et après transcription inverse, l'expression du gène codant la β -glucosidase candidate (noté *β -gluMDB*) a été étudiée par qPCR.

Un couple d'amorces permettant l'amplification d'un fragment de 100 pb a été dessiné. Un fragment unique a donc été amplifié chez les deux souches *D. seriata*, mais plusieurs produits de tailles différentes ont été amplifiés chez les souches *N. parvum*. La bande la plus intense obtenue chez ces souches a été excisée et séquencée. Le fragment obtenu présente des homologues de séquence avec des β -glucosidases. Un nouveau couple d'amorces spécifique à ces souches a donc été dessiné.

β -gluMDB n'est pas surexprimé lorsque *N. parvum* Bourgogne est mis en contact avec les différentes concentrations en saponines (**Figure 51**). Chez *N. parvum* Sainte Victoire, *β -gluMDB* est surexprimé lorsque ce champignon est mis en contact avec la solution de saponines concentrée à 30 mg/mL, cependant la différence d'expression est significative uniquement en comparaison avec les concentrations 0, 1 et 5 mg/ mL. On n'observe pas d'effet significatif des différentes concentrations en saponines sur l'expression de *β -gluMDB* chez *D. seriata* 98.1. *β -gluMDB* est surexprimé lorsque *D. seriata* 99.7 est mis en contact avec la solution de saponines concentrée à 30 mg/mL (**Figure 51**). En revanche, il n'est pas surexprimé lorsque ce champignon est confronté à des concentrations en saponines inférieures.

Cette hypothèse que nous avons choisie n'explique pas totalement la réaction des champignons face à un traitement à base de saponines supérieur à 1 mg/mL. En effet, si comme nous le prévoyions cette β -glucosidase était capable d'hydrolyser les saponines et ainsi de permettre au champignon de poursuivre sa croissance, la surexpression de *β -gluMDB* serait observable lorsque les souches se trouvent en contact avec des concentrations supérieures à 1 mg/mL.

Il est donc possible que la séquence identifiée comme une saponinase candidate ne soit pas capable de dégrader les saponines issues de *G. paniculata*. Les β -glucosidases appartiennent à des familles multigéniques et il est possible que le gène choisi ne soit pas celui qui code une enzyme capable d'hydrolyser les saponines. Une autre explication serait que le mécanisme de contournement de la toxicité de ce traitement n'implique pas l'action d'une saponinase.

3. Utilisation de saponines pour lutter contre des nématodes pathogènes de la vigne et impact environnemental de ce traitement

Comme nous l'avons présenté en introduction, la maladie du court-noué est très dommageable pour les viticulteurs. La recherche sur la lutte contre ses principaux agents vecteurs, les nématodes *Xiphinema index* et *X. diversicaudatum* semble indispensable à ce jour, du fait qu'aucune solution chimique n'est disponible pour prévenir l'apparition de la maladie dans les vignobles. Connaissant les propriétés nématicides des saponines (Argentieri et al. 2008; D'Addabbo et al. 2011), nous avons décidé de réaliser une étude dont l'objectif est de savoir si un traitement à base de saponines serait efficace pour lutter contre les nématodes, applicable au vignoble et peu dommageable pour l'environnement.

Dans un premier temps, dans l'étude préliminaire réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Gérard Demangeat de l'INRA ayant fait l'objet de la publication suivante, nous avons pu montrer que les saponines issues de *Q. saponaria* ont un effet nématicide sur *X. index* en milieu liquide. Une concentration de 0,3 mg/mL permet de tuer la totalité des nématodes de l'échantillon.

Fischer, M., Pensec, F., Demangeat, G., Farine, S., Chong, J., Ramirez-Suero, M., Mazet, F. and Bertsch, C., (2011). Impact of *Quillaja saponaria* saponins on grapevine ecosystem organisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**, 197–206

Dans la suite de l'étude, nous avons décidé de tester l'efficacité des saponines issues de *G. paniculata*, fournies par le Pr Max Henry et facilement extractibles. La première étape a été de vérifier l'effet nématicide de ces saponines en milieu liquide sur deux nématodes, *X. index* et *X. diversicaudatum*. Ce constat ayant été rempli, un test d'efficacité a été réalisé dans un échantillon de sol d'élevage des nématodes. Ceci nous a permis de prouver l'action de ces saponines dans le sol. Le but de ces expérimentations étant de fournir une méthode de lutte respectueuse de l'environnement, l'effet de ces saponines a été testé sur deux bioindicateurs de l'environnement de la vigne : le champignon mycorhizien *Glomus mosseae* et les populations bactériennes impliquées dans la nitrification du sol. Nous montrons que les saponines issues de la gypsophile n'ont pas d'effet sur ces bioindicateurs aux concentrations efficaces pour lutter contre les deux nématodes. Enfin, afin d'évaluer la rémanence du produit dans le sol, les concentrations de 5 saponines présentes dans le produit ont été suivies. Il apparaît que ces composés sont très rapidement dégradés dans le sol.

L'ensemble de ces analyses a fait l'objet de la publication suivante parue dans l'*Australian Journal of Grape and Wine Research*.

Publication n°2: *Gypsophila paniculata* root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration.

F. PENSEC, A. MARMONIER, A. MARCHAL, S. GERSCH, N. NASSR, J. CHONG, M. HENRY,
G. DEMANGEAT et C. BERTSCH

Australian Journal of Grape and Wine Research, 2013, 19, 439-445

Bilan

Les saponines sont donc efficaces pour lutter contre les nématodes, une concentration de 150µg/g de sol permet de diminuer la population de *X. index* de 73% et de *X. diversicaudatum* de 85%, cette concentration représente 450kg/ha (1ha=3000tonnes de sol). Cette dose est comparable à celles utilisées pour l'application des produits aujourd'hui interdits tels que l'aldicarbe ou le dichloropropène.

Les saponines paraissent donc être un bon moyen de lutte contre les nématodes vecteurs de virus responsables de la maladie du court-noué, car d'une part elles sont efficaces contre les nématodes et d'autre part elles n'affectent pas différents indicateurs de l'environnement de la vigne. Elles sont également rapidement efficaces contre les nématodes et rapidement dégradées dans le sol.

La dose à appliquer au vignoble suggérée par notre étude peut sembler élevée, et il sera important de réaliser un test au vignoble afin d'optimiser la dose, de déterminer la méthode d'application du traitement et de valider l'efficacité en conditions réelles.

Discussion générale et perspectives

1. Identification de triterpénoïdes synthétisés par la vigne et voies de biosynthèse

1.1 Bilan des analyses réalisées

En introduction, nous nous sommes demandé quel type de triterpénoïdes étaient produits par la vigne. Nous avons également précisé que les triterpénoïdes étaient composés de différentes classes : les phytostérols associés au métabolisme primaire et les triterpènes pentacycliques associés au métabolisme secondaire. La première approche de ce projet a été d'identifier par le biais de la chimie analytique les principaux triterpénoïdes associés au métabolisme secondaire, présents à la surface des baies et des feuilles de différents cépages cultivés en Alsace.

Au niveau des baies, les triterpénoïdes représentent une part importante des composés de la cire, de l'ordre de 40 à 80% selon le cépage. Cette teneur élevée est majoritairement liée à la présence d'acide oléanolique. La diminution des taux de triterpénoïdes au cours de la maturation est largement expliquée par la réduction des quantités d'acide oléanolique dans les baies. Cette constatation n'est pas retrouvée chez tous les fruits, bien que la composition en triterpène de la surface de l'olive soit également riche en acide oléanolique (Bianchi et al. 1992), la surface des pommes comporte majoritairement de l'acide ursolique (Ma et al. 2005) et la peau des tomates est riche en amyrines (Leide et al. 2007). Outre cette molécule, les triterpènes pentacycliques suivants sont également retrouvés à la surface des baies de la vigne : l' α -amyrine, l' α -amyrenone, la β -amyrine, l'erythrodiol, le lupéol, le germanicol, l'aldéhyde oléanolique et l'acide ursolique. Dans notre analyse, nous avons également identifié et évalué la quantité de triterpènes tétracycliques aussi nommés phytostérols et associés au métabolisme primaire tels que le β -sitostérol, le campestérol et le stigmastérol qui ont aussi été caractérisés chez la vigne dans d'autres études (Le Fur et al. 1994). Le phytostérol majoritaire est le β -sitostérol chez le cépage Chardonnay et il a été montré une corrélation négative entre les quantités totales de phytostérols et la maturation des baies durant les 5 dernières semaines avant les vendanges (Le Fur et al. 1994).

L'identification et la quantification des triterpénoïdes à la surface des feuilles de nos cépages d'étude ont également été conduites; les principaux triterpènes pentacycliques retrouvés sont l' α -amyrine, la β -amyrine, le lupéol, le taraxérol, l'acide oléanolique et l'acide ursolique. La cire des feuilles est différenciée de la cire des baies par les teneurs en acide oléanolique, les feuilles sont plus pauvres en

ce composé, les taux de triterpénoïdes sont donc inférieurs à ceux retrouvés chez les baies. Le résultat intéressant de cette analyse est la présence différentielle de lupéol ou de taraxérol chez l'ensemble des cépages étudiés : les feuilles de Gewurztraminer, Riesling et Sylvaner sont caractérisées par de forts taux de taraxérol et de faibles taux de lupéol, contrairement au Muscat, au Chasselas et aux trois Pinots. Dans le chapitre 1 des résultats, nous avons proposé une hypothèse selon laquelle les voies de biosynthèse de l'un et l'autre seraient interdépendantes puisque le cation taraxasterenyl à l'origine du taraxérol dérive du cation lupanyl précurseur du lupéol (Augustin et al. 2011).

Notre étude prouve bien l'intérêt de suivre l'évolution de ces triterpénoïdes chez différents cépages puisqu'ils sont caractérisés par des teneurs différentielles en ces composés qui pourraient être associés à des niveaux de défense différents face à des bioagresseurs. Cette étude pourrait être complétée par une analyse similaire réalisée sur chacun de ces cépages en conditions contrôlées afin de s'affranchir de l'hétérogénéité des conditions environnementales qui peuvent influencer la composition de la cire de différents organes. De plus, les analyses des teneurs en triterpènes libres à la surface des feuilles pourraient être étendues à un plus grand nombre de cépages.

Suite à l'identification et au dosage des triterpénoïdes, nous avons recherché les voies de synthèse de ces composés pour déterminer si leur expression différentielle pouvait expliquer les taux retrouvés dans les différents organes. Pour cela, nous avons réalisé une approche de gènes candidats. Neuf gènes codant des protéines présentant des homologies de séquence avec des triterpène synthases caractérisées, nommés *VvTPS* ont été identifiés. Ces gènes sont répartis sur 3 chromosomes et présentent des homologies fortes au niveau de la séquence codante, qui laissent supposer qu'ils pourraient être issus de duplications. Il semble qu'en général, l'expansion du nombre de TPS chez les plantes supérieures, soit due à des duplications en tandem suivies d'une sélection positive et diversifiante (Xue et al. 2012). De plus, les TPS présentes chez les dicotylédones dériveraient d'une lanostérol synthase ancestrale (Xue et al. 2012). Contrairement à l'origine commune des TPS chez les dicotylédones, nous avons pu souligner en **figure 42** que la séquence de la TPS caractérisée chez l'avoine était très différente des autres, ce qui suggère une autre origine. Cette enzyme dériverait d'une cycloarthénol synthase, elle est présente dans le génome à proximité d'autres enzymes impliquées dans la synthèse d'une saponine connue chez l'avoine, l'avénacine. Cette région n'est pas conservée chez d'autres céréales (Qi et al. 2004).

L'expression des *VvTPS* a été étudiée chez différents organes de la vigne : feuilles, tiges, racines, baies, vrilles et inflorescences. L'expression des *VvTPS* est globalement plus forte dans les tiges et les feuilles. *VvTPS6* chez les feuilles et *VvTPS5* chez les tiges sont particulièrement plus exprimés. Dans

les vrilles, les inflorescences, les baies et les racines, l'ensemble des gènes est plus faiblement exprimé. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues par Fasoli et al. (2012). Nous nous sommes donc intéressés aux feuilles dans la suite de cette étude.

Afin de savoir si la production différentielle de triterpénoïdes chez les différents cépages pouvait être expliquée par une expression différentielle des *VvTPS*, une comparaison entre la répartition des cépages selon leur profil lupéol/taraxérol et l'expression de nos gènes d'intérêt a été réalisée. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2 des résultats, la position de la *VvTPS10* sur l'arbre phylogénétique des OSCs (**Figure 42**) indique que cette enzyme a une séquence proche de celles de lupéol synthases. La comparaison des données issues des études d'expression et des analyses chimiques de la surface des feuilles a montré qu'il n'y a pas d'expression des gènes *VvTPS 6, 7 et 10* particulièrement associée à la présence différentielle de lupéol et de taraxérol (**Figure 44 A**). L'analyse des données d'expression de *VvTPS10* n'explique donc pas la production particulière de lupéol de certains cépages. De façon très notable, l'expression de *VvTPS5* et dans une moindre mesure celle de *VvTPS3* peut être mise en corrélation avec la production de lupéol (**Figure 44 A et B**). En effet, ce gène est très exprimé dans les feuilles des cépages qui en sont riches tandis qu'il est moins exprimé chez les cépages producteurs de taraxérol. Dans la suite de cette étude, il serait également intéressant d'étudier l'expression de nos *VvTPS* dans la pellicule des baies, qui produisent un composé majoritaire différent, l'acide oléanolique.

1.2 Perspectives et poursuite de l'étude : identification des produits formés par les TPS candidates chez la vigne

Ces premiers travaux sont l'étape préliminaire à l'identification des composés formés par nos 9 TPS candidates chez la vigne. L'étape suivante consistera en la caractérisation fonctionnelle de ces enzymes. Ce type de travaux a été très largement réalisé par différentes équipes afin de caractériser des TPS chez différentes plantes. Dans chacun des cas, une première approche par gène candidat est réalisée. Les gènes présentant des homologues de séquence avec des gènes codant des TPS déjà caractérisés sont sélectionnés. L'étape suivante peut varier, certaines équipes ont eu recours à l'expression hétérologue chez la levure. Cette méthode a permis notamment de caractériser une β -amyrine synthase (SITTS1) et une oxydosqualène cyclase multifonctionnelle (SITTS2) chez *Solanum lycopersicum* (Wang et al. 2011); une β -amyrine synthase (AsOXA1) chez *Aster sedifolius* (Cammareri et al. 2008); et une β -amyrine synthase (ATLUP1) et une oxydosqualène cyclase multifonctionnelle (ATLUP2) chez *Arabidopsis thaliana* (Husselstein-Muller et al. 2001). L'expression hétérologue de

MdOSC1 issue de *Malus x domestica* chez *Nicotiana benthamiana* a permis de caractériser cette enzyme comme étant capable de synthétiser à la fois de l' α et de la β -amyrine (Brendolise et al. 2011). Enfin, une méthode originale d'identification d'une β -amyrine synthase (GmBAS1) chez le soja a été réalisée par le biais de l'ARN interférence et du gene silencing ciblant ce gène. Les lignées transgéniques obtenues étaient incapables de produire de la β -amyrine (ou de très faibles quantités), la production de saponines par ces plantes était également affectée (Takagi et al. 2011). Une fois l'expression hétérologue réalisée, les produits sont généralement analysés par GC-MS.

Ces travaux ont déjà commencé en collaboration avec l'INRA. L'approche retenue a consisté à récupérer des ARN issus de différents tissus (feuilles, baies, racines, pépins). Les ADNc issus de la rétrotranscription des ARNm ont été utilisés pour des PCR avec des amorces spécifiques de chaque tri-TPS putative. Ces amorces amplifient entre le codon d'initiation et le codon stop. Les fragments amplifiés ont été sous clonés dans un vecteur d'entrée Gateway pDONOR. Après séquençage, les fragments ne présentant pas d'erreurs ont été utilisés pour un sous clonage dans les vecteurs d'expression hétérologue (pAG425GAL-ccdB, à promoteur inductible par le galactose et pAG415GDP-ccdB, à promoteur constitutif pour la levure ; pMDC32 à promoteur constitutif pour le tabac). Pour l'instant, il a été possible de cloner *VvTPS1*, 5, 8 et 9 dans chacun des vecteurs levure. L'identification des composés sera réalisée par GC-MS.

Les teneurs différentielles en triterpénoïdes retrouvés à la surface des feuilles pourraient aussi être dues à un polymorphisme de la séquence protéique de certaines OSCs. En effet, des expériences de mutagenèse ont montré que le changement d'un seul acide aminé dans le site actif pouvait avoir un effet très important sur les produits synthétisés par ces enzymes (Xu, Fazio et Matsuda 2004). Il serait donc intéressant de cloner les gènes de *VvTPS* de cépages riches en lupéol ou en taraxérol et de déterminer leur séquence.

2. Intérêt de la production de triterpénoïdes pour la défense des plantes et pour les consommateurs

2.1 Intérêt des triterpénoïdes dans la défense des plantes

Comme nous l'avons déjà précisé, la recherche sur les voies de protection des plantes par le biais de la synthèse de métabolites secondaires a focalisé l'attention des chercheurs ces dernières années. Les phytoalexines produites en réponse à une bioagression ont été particulièrement décrites chez la vigne. Peu d'études ont été réalisées sur les phytoanticipines qui, même si elles ne sont pas produites *de novo* en réponse à des défenses, fournissent un niveau de défense basal à la plante. Elles peuvent être rapidement mobilisables puisque le précurseur inactif est déjà présent et qu'une coupure enzymatique permet d'aboutir au composé actif (Osbourn 1996). Puisque la synthèse des saponines est régie par de nombreuses enzymes, il est difficile de lier directement l'expression d'un seul gène à la synthèse de saponines. Nous avons donc décidé d'étudier l'expression de gènes en amont de la voie de biosynthèse, impliqués dans la synthèse de génines, afin de vérifier s'ils étaient effectivement exprimés de manière constitutive chez la vigne. La mise en place de différents pathosystèmes confrontant des vitroplants ou des disques foliaires du clone entièrement séquencé PN40024 à différents bioagresseurs fongiques n'a pas mis en évidence la surexpression d'une des *VvTPS* de façon significative, à part *VvTPS10* dans le cas d'une infection par *P. viticola*. Il semble donc que, dans le cas de notre étude, la plupart de ces gènes ne soient pas induits par les infections fongiques. Cependant, il serait intéressant de suivre l'évolution de la composition triterpènes suite à une attaque par des bioagresseurs dans le cas d'interactions compatibles et incompatibles. Dans le cas d'interactions compatibles avec les agents de l'oïdium et du mildiou, on peut en déduire que les triterpènes présents à la surface des feuilles n'ont pas suffisamment protégé la vigne des infections contre ces agents pathogènes. Le niveau basal de défense conféré par la présence de triterpènes pourrait permettre à la plante de combattre plus facilement les infections contre d'autres bioagresseurs, cela reste à tester.

La mise en relation du contenu en triterpénoïdes chez les plantes avec leur niveau de résistance face à des attaques par des agents pathogènes a été particulièrement étudiée chez les plantes productrices de saponines. En effet, il a été montré que les taux de saponines présents dans les organes sont corrélés à une meilleure résistance des plantes aux infections par des champignons ou des insectes (Agrell et al. 2003; Papadopoulou et al. 1999). Cependant, puis qu'il a également été montré que certains agents pathogènes sont capables de détoxifier les saponines en hydrolysant les chaînes osidiques (Bowyer et al. 1995; Bouarab et al. 2002), on peut se demander si les génines ou

triterpènes sont toxiques pour les agents pathogènes (aux doses produites par les plantes). Il semble que la réponse à cette question dépende du triterpène, et certainement de l'agent pathogène. Il a par exemple été montré que les feuilles de *Rhododendron spp.* résistantes à des attaques de l'insecte *Stephanitis pyrioides* contenaient des taux élevés d'acide ursolique, tandis que les plants sensibles étaient caractérisés par des taux élevés de β - et d' α -amyrine (Wang et al. 1999). Les jeunes baies subissent en général moins d'infections fongiques que les baies matures (Commenil et al. 1997), on pourrait donc supposer que les taux importants d'acide oléanolique présents à la surface des jeunes baies leur permettrait de résister aux infections. La diminution significative des teneurs en acide oléanolique au cours de la maturation pourrait rendre les baies plus sensibles aux bioagresseurs. Suite à la caractérisation fonctionnelle des VvTPS dans la levure, il pourrait être envisagé de surexprimer certains candidats chez la vigne de façon stable et de tester les conséquences sur les teneurs en triterpènes et la résistance à différents types de bioagresseurs.

2.2 Intérêt des triterpénoïdes pour les consommateurs de raisin, de vin ou de feuilles de vigne

La surface des baies et des feuilles de vigne est recouverte de nombreux types de triterpénoïdes. Il semble donc intéressant de se demander si de tels composés présentent un intérêt pour les consommateurs. La notion de « French paradox » liée à la consommation modérée de vin est maintenant bien connue. Malgré la consommation de graisses saturées, la France présente de faibles taux de mortalité liés aux maladies cardiovasculaires. Cette observation a été mise en relation avec la consommation de composés phénoliques via le vin rouge (Frankel et al. 1993). La consommation de vin rouge est également associée à un rôle protecteur vis-à-vis de la démence et de la maladie d'Alzheimer (Orgogozo et al. 1997) ainsi qu'à un allongement de la durée de vie (Streppel et al. 2009). De plus, la consommation de raisins est positivement corrélée à la réduction des caries et des troubles hépatiques (American Society for Microbiology 2005). Dans la revue coécrite avec le Dr Anna Szakiel et présentée à la fin du chapitre 2 des résultats (Szakiel et al. 2012), nous avons relevé les différentes propriétés des triterpénoïdes produits par la vigne et leur intérêt pour la santé humaine. Il a été montré que des triterpènes tels que l'acide ursolique ou l'acide oléanolique ont des propriétés anticancéreuses, anti-inflammatoires, antidiabétogènes, antimicrobiennes, hépato- et cardioprotectrices, anti-VIH (Liu 2005; Yeung et Che 2009). Le lupéol est associé aux mêmes effets sur la santé humaine et permet également la réduction des taux de cholestérol (Siddique et Saleem 2011). La consommation de tels composés présente donc de nombreux bénéfices pour la santé et il

pourrait y avoir un intérêt à consommer préférentiellement les baies issues de cépages qui en sont riches.

On peut également se demander si ces triterpènes n'influent pas le goût du raisin et donc du vin. Les phénols sont les principaux métabolites secondaires considérés comme des marqueurs des qualités organoleptiques du raisin. Cependant, une récente étude a montré l'intérêt des saponines dans les qualités gustatives du vin. En effet, par une méthode appelée chromatographie à partition centrifuge-gustatométrie, différents composés du vin ont été isolés et caractérisés, puis goûtés. Deux saponines ont été identifiées, elles proviendraient du bois de chêne utilisé pour la fabrication des tonneaux dans lesquels est stocké le vin et l'une d'entre elle serait associée à un goût sucré (Marchal et al. 2011).

3. Utilisation d'un traitement à base de saponines pour lutter contre des agents pathogènes de la vigne : bilan et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons tenté de définir si la vigne était capable de produire des saponines, phytoanticipines actives contre une large gamme d'agents pathogènes (Francis et al. 2002). Notre étude préliminaire sur la recherche de saponines dans l'écorce de vigne nous a conduit à conclure que si des saponines étaient produites par la vigne au niveau du bois, elles l'étaient en très faible quantité et donc difficilement identifiables. D'après ce constat, il nous est impossible d'imaginer un traitement contre des agents pathogènes à base de saponines issues de vigne. Nous nous sommes donc tournés vers des plantes fortement productrices de saponines : *Quillaja saponaria* et *Gypsophila paniculata*.

3.1 Traitement à base de saponines pour lutter contre des agents pathogènes fongiques de la vigne : perspectives

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact des saponines issues de l'écorce de *Q. saponaria* sur la croissance du mycélium de différentes souches de champignon responsables de la pourriture grise et de champignons impliqués dans le Black Dead Arm. Dans un deuxième temps, l'effet des saponines issues de la gypsophile a été testé de la même manière sur des souches de champignons associées au BDA. Ces tests montrent que l'effet des saponines dépend de la souche de champignon considérée. Cet effet souche face à un traitement aux saponines du quillaja a également été observé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Fischer et al. 2011). La croissance des souches de référence

de *B. cinerea* peut être totalement inhibée par des fortes concentrations en saponines issues de *Q. saponaria*, tandis que la croissance des souches isolées au vignoble et des souches associées au BDA semblent présenter un mécanisme de résistance à de tels traitements, même aux concentrations les plus fortes. Dans leur étude, Ribera et al. (2008) ont montré que des extraits de tiges de *Q. saponaria* n'inhibaient pas totalement la croissance du mycélium de *B. cinerea* (souche G29), de l'ordre de 60 à 80% d'inhibition avec une concentration de 1 mg/mL. Cependant, ces extraits, utilisés en prétraitement de feuilles de fraisiers, ont limité l'apparition des symptômes de la même manière que des fongicides d'origine naturelle ou synthétique utilisés habituellement. Ces résultats sont à nuancer, car les extraits testés contenaient majoritairement des saponines, mais aussi les acides chlorogénique, caféique, vanillique, et salicylique ainsi que de la scopolétine, composés connus pour leur action antifongique et stimulatrice des réponses de défense.

Nos résultats nous ont également permis de remarquer qu'à partir de concentrations supérieures à 1 mg/mL, l'inhibition de la croissance n'augmentait pas chez la plupart des souches. Il semblerait donc qu'elles soient capables de contourner la toxicité des saponines. Pour confirmer cela, nous sommes partis de l'hypothèse que comme dans le cas de certains champignons (Bouarab et al. 2002; Quidde et al. 1999), nos souches étaient capables de produire des β -glucosidases aussi appelées saponinases capables de détoxifier les saponines. Pour cela, nous avons évalué l'expression d'un gène présentant des similarités avec des β -glucosidases fongiques après contact de nos souches de champignons associés au BDA avec différentes concentrations en saponines. Nous n'avons pas pu établir clairement de lien entre la résistance des souches et l'activation de ce gène identifié comme codant une potentielle β -glucosidase.

D'après ces premiers résultats, il semblerait qu'un traitement à base de saponines ne soit pas suffisamment efficace pour lutter contre *B. cinerea* et les souches de champignon associées au BDA. De plus, les doses testées étaient relativement élevées et ne sembleraient pas applicables au vignoble à des coûts raisonnables. Il pourrait cependant être intéressant de tester l'effet de tels traitements sur d'autres agents pathogènes fongiques tels que *Plasmopara viticola* ou *Erysiphe necator*. Le prétraitement de feuilles avec ces saponines avant inoculation pourrait également être mis en place afin de vérifier si, bien que les saponines n'inhibent pas totalement la croissance des champignons, elles la limitent suffisamment pour que les mécanismes de défense de la plante puissent être mis en place et combattre l'infection.

3.2 Perspectives de l'utilisation des saponines pour lutter contre les nématodes vecteurs du GFLV : les mises au point à réaliser

Nous avons également voulu déterminer si un traitement à base de saponines pouvait être intéressant pour lutter contre des nématodes vecteurs du GFLV et contre lesquels aucun traitement n'est actuellement disponible. Une première étude préliminaire en milieu liquide a été réalisée et a permis de valider la toxicité des saponines issues de la gypsophile envers *Xiphinema index* et *X. diversicaudatum*. La suite de l'étude a été réalisée dans des échantillons de sol en conditions contrôlées. Nous avons pu montrer qu'un traitement par 150 µg de saponines/g de sol permettait de réduire les populations de nématodes de 73 à 85% selon l'espèce et correspondait à des doses similaires aux anciens traitements appliqués pour désinfecter les sols. Afin d'évaluer l'impact d'un tel traitement sur l'environnement, nous avons choisi deux bioindicateurs : le champignon mycorhyzien *Glomus mosseae* et l'activité de nitrification dans le sol. Les tests ont été réalisés selon des normes AFNOR et ont permis de montrer qu'aux doses efficaces contre les nématodes, un traitement à base de saponines n'affectait pas significativement les deux bioindicateurs.

Forts de ce constat, plusieurs points restent à présent à éclaircir afin de pouvoir proposer un traitement directement applicable par les viticulteurs. D'une part, la manière d'apporter le traitement reste à définir puisque les nématodes se situent majoritairement dans les horizons du sol situés en deçà de 50 cm, au niveau de la zone de développement des racines de la vigne. Afin de les atteindre, il faudrait apporter le traitement lors du labour de la parcelle contaminée ou de la partie arrachée d'une parcelle. On peut également imaginer utiliser le système d'injection sous pression des anciens produits nématicides qui était enfoncé dans le sol et projetait le traitement en profondeur grâce à la pression appliquée. Cette méthode pourrait être appliquée dans des zones restreintes correspondant à l'arrachage de quelques pieds de vigne. D'autre part, il faudrait pouvoir être capable d'extraire les saponines en grande quantité et à moindre coût pour proposer un traitement économiquement viable pour les viticulteurs. Enfin, afin de lutter contre les nématodes, il me semble que la solution ne viendra pas de l'application d'une seule méthode de lutte, mais de l'intégration d'un ensemble de stratégies comme la prophylaxie, l'utilisation du porte-greffe Nemadex Alain Bouquet dans les sols favorables à son implantation, l'utilisation de plantes couvre sol à effet nématicide ou nématifuge et le traitement à base de saponines des zones infectées localisées.

3.3 Compréhension du mode d'action des plantes couvre-sol à effet nématocide

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 3 de l'introduction, la culture de certaines plantes couvre-sol permet de réduire plus fortement les populations de nématodes qu'un sol nu, c'est le cas de *Lotus corniculatus*, *Lupinus albus*, *Trifolium pratense*, *Medicago* spp. et *Avena sativa* entre autres. Le mécanisme d'action de ces plantes n'étant pas connu, on peut faire l'hypothèse qu'elles seraient capables de produire des métabolites répulsifs ou toxiques pour les nématodes. En outre, toutes ces plantes sont connues pour leur production de saponines (Walter 1961; Muzquiz et al. 1993; Tava et Odoardi 1996; Kolodziejczyk-Czepas 2012; Luning et Schlosser 1976), composés à action nématocide (Francis et al. 2002). Il est donc possible que l'activité nématocide de ces plantes soit liée à une exsudation de saponines dans le sol. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons démarré une étude en collaboration avec Coralie Laveau (Vitinov, Bordeaux) qui nous a fourni des graines d'espèces couvre sol nématocides ou associées à une augmentation des populations de nématodes, le Dr Philippe Laval-Gilly (Université de Lorraine) qui a permis la collecte des exsudats racinaires de ces plantes et le Dr Axel Marchal (ISVV de Bordeaux) qui a réalisé les analyses de la composition de ces exsudats. Le but de cette étude était de définir d'une part si des saponines étaient retrouvées dans ces exsudats et d'autre part si les doses de saponines exsudées pouvaient être responsables de la diminution des populations de nématodes situées au niveau des zones où les plantes couvre sol étaient installées. Les manipulations sont en cours, mais nous avons d'ores et déjà pu identifier des composés similaires aux saponines dans la majorité des exsudats de plantes à effet nématocide tandis que les plantes hôtes pour les nématodes que nous avons testées n'en produisent pas.

4. Bilan : les avancées engagées par ce travail de thèse

Cette thèse réalise l'intégration de plusieurs approches pour caractériser la production et l'intérêt d'une famille de molécules peu étudiée chez la vigne et associée aux défenses basales des plantes : les triterpénoïdes. D'une part, cette étude établit pour la première fois une quantification de ces composés à la fois à la surface des baies et des feuilles, mais aussi chez différents cépages cultivés. D'autre part, la famille des oxidosqualène cyclases n'a encore jamais été caractérisée chez la vigne. Nous avons pu réaliser un premier état des lieux indiquant les gènes candidats chez la vigne, et leurs niveaux d'expression selon les organes, les cépages et face à des stress. D'autre part, les saponines, utilisées actuellement comme adjuvant dans les produits sanitaires (San Martin et Briones 1999) de par leurs propriétés de surfactants, pourraient également être utilisées comme substances actives

contre des nématodes vecteurs du court-noué chez la vigne. En effet, leur innocuité sur différents indicateurs de l'environnement et leur toxicité rapide envers les nématodes en font une substance active intéressante au regard de la nouvelle législation sur les produits phytosanitaires. Les molécules issues de plantes sont peu nombreuses à être utilisées en tant que traitement chez les plantes et cette étude indique le potentiel des saponines en tant que molécules actives contre une large gamme d'agents pathogènes.

Matériel et Méthodes

Tableau 6 : Composition du milieu Woody Plant Medium (pour 1 L)

Composition	Masse (g)
Saccharose	15
Poudre Woody Plant medium (Duchefa)	2.462
Agar	6.5
pH 6,2	

Tableau 7 : Dates de récolte et organes prélevés au vignoble pour analyses chimiques

Organe et stade	Date de récolte
Feuilles stade adulte	07/07/11
Baies stade petit pois	27/06/11
Baies avant véraison	25/07/11
Baies post véraison	22/08/13

Tableau 8 : Dates de récolte des feuilles prélevées au vignoble pour analyses moléculaires

Stade de développement	Date de récolte
Feuilles stade adulte	06/09/12
	18/07/13
Feuilles vernissées	18/07/13

1. Le matériel vivant

1.1 Matériel végétal utilisé

1.1.1 Vitroplants de vigne et sevrage

Le clone de vigne utilisé est issu de l'autofécondation du Pinot noir, il s'agit de la lignée PN40024, dont le génome a été entièrement séquencé. Ce clone a été gracieusement fourni par l'INRA de Colmar.

Les vitroplants de vigne ont été obtenus par bouturage sur le « Woody Plant Medium » présenté en **tableau 6**. Les vitroplants ont été placés dans une chambre climatisée à 25°C sous photopériode réglée à 16h de jour et 8h d'obscurité.

Les vitroplants âgés de 6 à 8 semaines ont été repiqués dans du terreau et placés sous atmosphère humide pendant une semaine. Ils ont ensuite été placés 2 à 3 semaines dans une chambre de culture pour être sevrés (25°C, photopériode de 16h de jour et 8h de nuit, à 70% d'humidité).

1.1.2 Récolte d'organes de différents cépages au vignoble

Pour nos analyses, 8 cépages cultivés en Alsace ont été utilisés. Il s'agit de : Pinot noir, Pinot gris, Pinot auxerrois, Riesling, Muscat, Sylvaner, Gewurztraminer, Chasselas. Un autre cépage caractérisé par sa pellicule phénotypiquement différente des autres cépages, le Pinot moure, a également été étudié. Les organes d'intérêt ont été récoltés au vignoble sur plusieurs plantes différentes afin d'homogénéiser le prélèvement.

Pour l'analyse des composés présents dans la pellicule des baies et des feuilles, les dates de collecte sont indiquées dans le **tableau 7**.

Pour les analyses en biologie moléculaire, les feuilles des 8 cépages cultivés en Alsace ont été récoltées aux dates et stades indiquées dans le **tableau 8**.

Tableau 9 : Composition du milieu PDA pour la culture des champignons, pour 1 L de milieu.

Composé	Masse (g)
Potato Dextrose Agar	26,5
Agar	20

1.2 Les agents pathogènes cryptogamiques étudiés

1.2.1 Mise en culture des champignons étudiés, préparation de milieux

Les champignons ont été cultivés sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) d'après la composition présentée dans le **tableau 9**. Ils ont été repiqués toutes les 3 semaines et placés à température ambiante.

1.2.2 Les souches fongiques utilisées

1.2.2.1 *Botrytis cinerea*

Les souches de *Botrytis cinerea* T4 et B05.10 ont été fournies par le Dr Hélène Brygoo (INRA, Versailles). Les souches non référencées isolées au vignoble ont été fournies par le Dr Muriel Viaud (INRA Versailles). Elles sont maintenues sur milieu PDA gélosé.

Lorsque la récolte de spores était nécessaire, les souches ont été placées sous un néon à température ambiante. L'ensemble du mycélium et des spores a été gratté à l'aide d'une spatule stérile, puis 10 mL d'eau stérile ont été ajoutés. La solution récupérée a été filtrée sur miracloth. La solution de spores obtenue a été lavée deux fois à l'eau stérile et centrifugée à chaque fois à 4000 rpm pendant 15 mn. Les spores ont été resuspendues, leur concentration a été déterminée à la cellule de Malassez puis ajustée à 5.10^7 spores/mL dans de l'eau stérile contenant 15% de glycérol. Les solutions de spores sont conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.2.2.2 *Plasmopara viticola*

Plasmopara viticola a été fourni par le Dr Sabine Wiedemann-Merdinoglu (INRA Colmar). Etant donné qu'il s'agit d'un oomycète biotrophe, ce dernier a été multiplié sur du matériel végétal vivant par repiquage tous les 7 jours sur cépage sensible (Muscat ottonel ou Chardonnay). Les spores de *P. viticola* ont été récupérées à partir de feuilles infectées placées dans un tube contenant de l'eau stérilisée et vortexées. La concentration de la solution de spores récupérée a été déterminée à la cellule de Malassez.

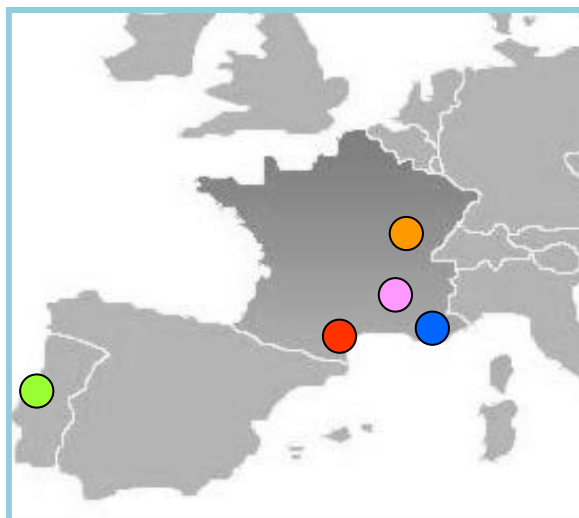


Figure 52 : Origine des prélèvements des différentes souches de champignons associés aux maladies du bois. ●: *N. Parvum* Bourgogne, ● *N. Parvum* Sainte Victoire, ●: *D. seriata* 98.1, ● : *D. seriata* 99.7 (M. Ramirez-Suero)

1.2.2.3 Les souches de champignons impliquées dans les maladies du bois

Différentes souches de champignons de la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été utilisées pour nos analyses : *Neofusicoccum Parvum* Bourgogne, *N. Parvum* Sainte Victoire, *Diplodia seriata* 98.1 et *D. seriata* 99.7. Elles proviennent de différentes régions en France et au Portugal (**Figure 52**). Elles ont été maintenues sur du milieu PDA et repiquées toutes les 3 semaines.

1.3 Infections de la vigne par des champignons et un oomycète

Le matériel végétal utilisé était à chaque fois le clone PN40024 de vigne, issu de Pinot noir dont le génome a été entièrement séquencé.

1.3.1 Infection de disques foliaires par *Plasmopara viticola*

Les disques foliaires ont été placés dans des boîtes de Pétri sur du papier Whatman humide puis infectés par spray ou dépôt de gouttes de l'inoculum sur leur face inférieure. Les concentrations de spores utilisées étaient de $5 \cdot 10^4$ spores/mL. Les boîtes ont ensuite été scellées puis placées en chambre de culture à 21°C, d'abord à l'obscurité pendant 24h, puis sous une photopériode 16h de jour/8h de nuit pendant 6 jours. La sporulation était visible 4 à 5 jours après inoculation. Pour chaque point de la cinétique d'infection, 3 x 100 mg de tissus infectés provenant d'un pool de 2 feuilles ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

1.3.2 Infection de disques foliaires par *Erysiphe necator*

Des feuilles détachées de PN40024 ont été inoculées par des conidies d' *E. necator* selon la méthode décrite par Le Henanff et al (2011).

1.3.3 Infection de vitroplants et de disques foliaires par *Botrytis cinerea*

Des vitroplants de vigne ont été directement infectés par dépôt de gouttes de suspension de spores de *Botrytis cinerea* ($5 \cdot 10^5$ spores/mL) préparées dans du milieu malt (15g/L) contenant du glucose (0.1 M). A chaque point de la cinétique d'infection, des feuilles de vitroplants ont été prélevées et congelées à l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

1.4 Test d'efficacité des saponines sur la croissance de champignons

Les solutions de saponines issues de *Quillaja saponaria* (Sigma-Aldrich) ou de *Gypsophila paniculata* (fournies par le Pr Max Henry, faculté de Pharmacie, Nancy) doivent être ajoutées après autoclavage des milieux PDA à pH6. Six concentrations ont été testées : 0 mg/mL ; 0,5 mg/mL ; 1 mg/mL ; 5 mg/mL ; 10 mg/mL ; 30 mg/mL. Afin de ne pas ajouter un volume trop important de solution de saponines dans les milieux, et donc afin d'éviter un effet de dilution, deux solutions-mère de concentrations élevées ont été réalisées : l'une à 125 mg/mL pour les solutions à 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, et 5 mg/mL ; l'autre à 625 mg/mL pour les solutions à 10 mg/mL et 30 mg/mL. Ces deux solutions-mère ont été filtrées à 0,45 µm. Les volumes nécessaires pour réaliser les différentes solutions de saponines ont été ajoutés aux différents milieux PDA préparés.

Pour chaque souche de champignon testée (4 souches de champignons impliqués dans les maladies du bois et les 6 souches de *B. cinerea*), un plug de mycélium de 0,5cm² a été prélevé et placé sur les milieux contenant différentes concentrations en saponines. Les mesures de la taille du mycélium sont effectuées par trois mesures partant du bord du plug de mycélium afin de s'affranchir du manque d'homogénéité dans la croissance des champignons. Trois répétitions techniques et deux répétitions biologiques ont été réalisées.

1.5 Test d'efficacité des saponines sur la mortalité des nématodes et sur des indicateurs de l'environnement

Le détail de ces tests est présenté dans la publication p 109.

Tableau 10 : Systèmes de solvants utilisés pour les migrations de saponosides et de sapogénines

Détection des saponosides (en volume)		Détection des sapogénines (en volume)	
Chloroforme	15	Chloroforme	9
Méthanol	8	Méthanol	1
Eau	1,5		

Tableau 11 : Système de solvants préparé pour la DCCC

Solvant	Proportion volumique (%)
Chloroforme	43
Méthanol	37
Eau	20

2. Identification de triterpénoïdes chez la vigne

Tous les solvants utilisés pour les extractions et les analyses étaient de qualité analytique.

2.1 Identification de saponines dans l'écorce de vigne

2.1.1 Extraction à partir de l'écorce

L'écorce a été retirée de rameaux d'un an de Gewurztraminer. Après broyage, les composés ont été extraits par macération dans un mélange MeOH:Eau (50:50), dans la proportion 10 g/ 100 mL de solvant. Ce mélange a été placé au sonicateur et à 30°C pendant 30 mn, puis filtré sur verre fritté. Ce filtrat a ensuite été évaporé dans un évaporateur rotatif réglé à 40°C. Cet échantillon concentré a ensuite été utilisé pour les différentes analyses.

2.1.2 Chromatographies sur couche mince

Les chromatographies ont été faites sur des plaques de gel de silice 20 x 20 cm (Merck). Les dépôts ont été réalisés à 1 cm du bas de la feuille. La plaque a été placée dans un système de solvant adapté au type de composé à révéler, ces systèmes sont décrits dans le **tableau 10**. Les révélations ont été réalisées par aspersion d'acide sulfurique 20% dilué dans du méthanol, puis chauffage à l'étuve 110°C pendant 15 à 20 mn. Certains composés fluoresçaient aux UV, la plaque chromatographique a donc été observée aux UV avant la mise à l'étuve.

2.1.3 Fractionnement de l'extrait d'écorce de vigne

Première purification par Droplet CounterCurrent Chromatography (DCCC)

Le principe de la DCCC est basé sur le partage différentiel d'analytes entre deux phases. La solution à fractionner peut se déplacer entre les phases selon son coefficient de partage. Un coefficient de cloison est un rapport de la quantité d'analyte trouvée dans chacun des solvants à l'équilibre. L'appareil est constitué d'une succession de tubes communiquant dans lesquels les solutions passent. Un système de solvants constitué de deux phases a été préparé (**Tableau 11**). La DCCC en phase inférieure descendante consiste à remplir les tubes de phase supérieure (moins dense), puis à injecter 15 mL de la solution à analyser mélangée avec un volume de phase supérieure et un volume de phase inférieure (1/3 : 1/3 : 1/3). La phase inférieure (plus dense) a ensuite été injectée dans

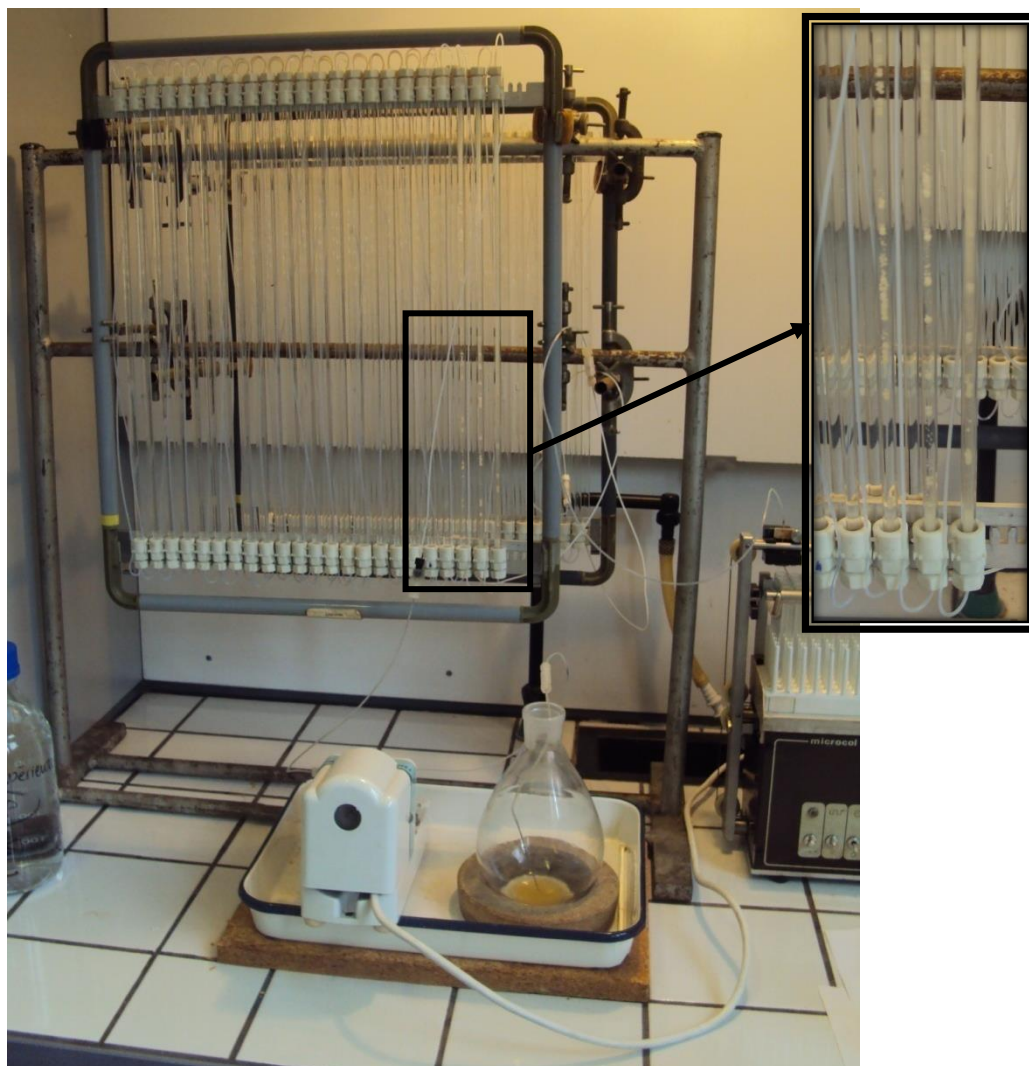


Figure 53 : Appareil permettant la Droplet CounterCurrent Chromatography (DCCC)

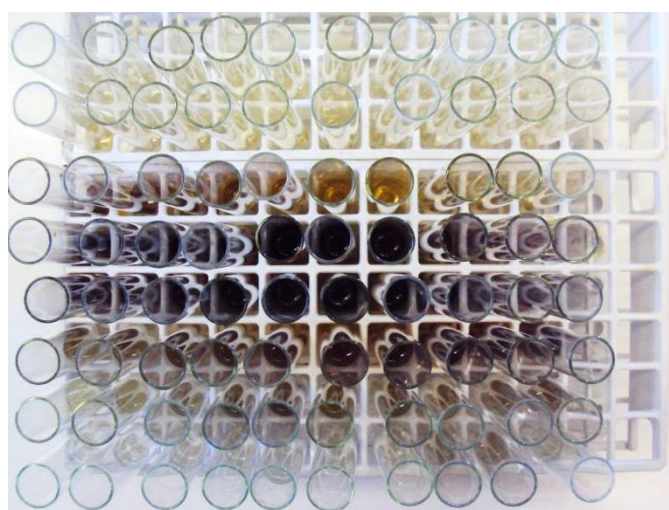


Figure 54 : Fractions récoltées dans les tubes collecteurs en sortie de DCCC ; les produits sont séparés selon leur polarité

l'appareil avec un débit d'environ une goutte par seconde. Les gouttelettes de phase inférieure plus denses traversent le produit à analyser en récoltant les produits miscibles avec cette phase (**Figure 53**). Des tubes collecteurs ont été placés en fin de circuit et ont permis de récupérer les différentes phases contenant les produits séparés dans le temps au cours de l'élution (**Figure 54**).

Deuxième purification par HPLC préparative

Cette méthode de séparation de produits a été utilisée dans notre étude en complément de la DCCC, c'est-à-dire pour séparer les produits obtenus dans une même fraction issue de la DCCC. Le but étant de purifier la quantité maximale de produits en un minimum d'injections, il est possible d'injecter une masse de l'ordre du milligramme dans le cas de l'HPLC préparative. Le système est composé de deux pompes (Waters, Model 510) permettant d'établir un gradient de solvants, d'un système d'injection manuel, d'une colonne de silice à polarité de phase inversée C18 (LiChrospher RP18 endcapped 5 μ m), d'un détecteur UV (Lambda-Max, Model 481) et de tubes collecteurs. Dans le cadre de notre étude, pour l'analyse de composés relativement polaires, notre gradient a été effectué manuellement; le gradient était modifié d'une unité à chaque fois que l'ensemble des produits étaient sortis de la colonne pour un système de solvant donné. Le gradient de méthanol et d'eau a été établi (en volume) de 5 : 0 (H₂O : MeOH) à 0 : 5 (H₂O : MeOH).

2.1.4 Identification des composés extraits

Les échantillons susceptibles de contenir des composés de la même polarité que des saponines ont été envoyés pour analyse à l'Unité de recherche Œnologie de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin de Bordeaux, où le Dr Axel Marchal a pu, après analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à transformée de Fourier (LC-FTMS), déterminer les formules brutes des composés majoritaires retrouvés dans les extraits.

2.2 Identification de triterpénoïdes à la surface des baies et feuilles de vigne

2.2.1 Extraction des triterpénoïdes de la cire des baies

La pellicule externe des baies et des feuilles de différents cépages présentés dans le **tableau 7** a été extraite par un bain de 30 s dans du chloroforme à température ambiante. Les extraits ont été décantés jusqu'à évaporation totale du solvant. La quantité d'extrait obtenue a été pesée et

rapportée à la masse de poids sec de l'échantillon. Le poids sec a été défini après placement à l'étuve de lots témoins de baies et feuilles. Des triplicats de chaque modalité ont été réalisés.

2.2.2 Séparation des différentes fractions de produits

Après la pesée, les extraits obtenus ont été séparés par CCM préparative sur des plaques de verre coatées avec une couche de 0,25 mm de gel de silice 60G de dimension 20 cm x 20 cm (Merck), par un système de solvant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3, v/v). Quatre fractions ont ainsi été obtenues : la fraction des stéroïdes libres et des triterpènes neutres, la fraction des acides triterpéniques, la fraction des esters et celle des glycosides de triterpènes. Ces fractions ont été localisées sur plaque par comparaison avec différents standards : l' α -amyrin et l'ester méthylique de l'acide ursolique (Roth), l' α -tocopherol (Merck), la β -amyrine, le lupéol, l'uvaol, l'acide oléanolique, le campesterol, le cholestérol, le sitosterol et le stigmasterol (Sigma-Aldrich). La révélation de la plaque a été réalisée par spray d'une solution de H_2SO_4 à 50%, suivi d'un passage sous un flux d'air chaud. Les fractions ont été éluées du gel de silice dans 10 volumes de diéthyle éther comparé au volume de gel retiré. Les fractions contenant les triterpènes libres et les stéroïdes ont directement été analysées par GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry), tandis que les fractions contenant les acides triterpéniques ont d'abord été méthylées au diazométhane, les esters ont été soumis à une hydrolyse alcaline et les fractions contenant les glycosides de triterpènes subissent une hydrolyse acide.

La méthylation des acides triterpéniques :

Le N-méthyl-N-nitrosurée (2,06 g) a été ajouté au mélange de 20 mL de diéthyle éther et de 6 mL de KOH aqueux 25%. La phase organique a été lavée trois fois à l'eau (3 x 50 mL) et séparée de la phase aqueuse. Les échantillons contenant des acides triterpéniques ont été dissous dans 2 mL de la solution obtenue de diazométhane dans du diéthyle éther et stockés à 2°C pendant 24 h.

L'hydrolyse alcaline :

La fraction des esters a été soumise à une hydrolyse alcaline avec 10% de NaOH dans un MeOH à 80%, durant 3 h à 80°C. Puis 5 volumes d'eau ont été ajoutés à chaque hydrolysate, le pH a été neutralisé avec du CH_3COOH à 5%, et les mélanges obtenus ont été extraits au diéthyle éther (3 x 10 mL). Ces extraits ont été fractionnés par CCM préparative comme décrit précédemment, et les fractions contenant les alcools triterpéniques libres et les stérols ont directement été analysées par GC-MS, tandis que les fractions d'acides triterpéniques ont été méthylées avant analyse.

L'hydrolyse acide :

La fraction des glycosides triterpéniques a été soumise à une hydrolyse acide avec 10% de HCl dans du MeOH 80%, durant 3 h à 80°C. Puis 5 volumes d'eau ont été ajoutés à chaque hydrolysate, et les mélanges obtenus ont été extraits et analysés comme décrit précédemment.

2.2.3 Identification des produits triterpéniques extraits

Un chromatographe en phase gazeuse Agilent Technologies 7890A a été utilisé pour les analyses qualitatives (détecteur spectrométrique de masse 5975C) et quantitatives (FID, Flame Ionization Detector). Les échantillons dissous dans un mélange diéthyle éther:méthanol (5:1) ont été injectés (1-4 µL) avec division 1:10. Tous les échantillons ont été analysés en triplicats. La colonne utilisée mesure 30 m x 0.25 mm x 0,25 µm (HP-5MS Agilent Technologies). Le gaz porteur utilisé est l'hélium et le flux est réglé à 1 mL/mn. Les paramètres utilisés ont été les suivants : température de colonne réglée à 180°C, température du collecteur et du FID de 290°C, température de la ligne de transfert MS de 275°C, température du quadripôle de 150°C, température de la source d'ion de 230°C, EI 70eV, gamme m/z 33-500, flux du générateur d'hydrogène réglé à 30 mL/ mn, flux d'air à 400 mL/mn. Les composés ont été identifiés en comparant leur spectre de masse avec la base de données Wiley 9th ED. & NIST 2008 Lib. SW (Version 2010) ou des données de la littérature ainsi que par la comparaison de leurs temps de rétention et les spectres de masse correspondant à ceux des standards. La quantification a été effectuée à l'aide d'une méthode basée sur la calibration des courbes de standards représentatifs de chaque groupe de triterpénoïdes : α -amyrine, uvaol, ester méthylique d'acide oléanolique et sitostérol.

Tableau 12 : Composition du tampon Tris EDTA (TE) pH8,5

Composé	Concentration (mM)
EDTA	50
Tris-HCl	10

Tableau 13 : Composition du tampon d'extraction pH8

Composé	Concentration (mM)
EDTA	25
Tris-HCl	200
NaCl	250
SDS	0.5%

Tableau 14 : Composition du tampon de lyse modifié, dilution dans du tampon RLT (Qiagen)

Composé	Concentration
PVP-40	2,5% (p/v)
β -mercaptoéthanol	1% (v/v)

3. Biologie moléculaire, identification de gènes et analyse de leur expression

La liste des couples d'amorces utilisés pour les différentes amplifications est fournie en **annexe 1**.

3.1 Extractions d'ADN

3.1.1 Extractions d'ADN de champignon Ascomycète

Quelques hyphes des souches de champignon *N. parvum* et *D. seriata* âgés de 10 jours ont été récoltés en milieu stérile à partir de cultures sur milieu solide. Ils ont été ajoutés à 500 µL de PDA liquide dans un tube eppendorf de 2 mL et placés à 22°C pendant 72 h. Le tube a ensuite été centrifugé à 14000 rpm pendant 10 mn. Le surnageant a été évacué et 500 µL de tampon TE (**Tableau 12**) ont été ajoutés. Une centrifugation a été réalisée à 13000 rpm pendant 5 mn. Après retrait du surnageant, une bille métallique a été ajoutée dans le tube qui a ensuite été refroidi à l'azote liquide. Un broyage a été réalisé à l'aide d'un broyeur à bille pendant 90 s à 30 pulsations/mn. 1 µL de RNase et 300 µL de tampon d'extraction (**Tableau 13**) ont été ajoutés au broyat et placés 15 mn à 37°C. On a ensuite ajouté 150 µL d'acétate de sodium 3 M et l'ensemble de la solution a été placé à -20°C pendant 10 mn. Le tube a été centrifugé à 6500 rpm pendant 10 mn à -5°C. Le surnageant a été récupéré et le même volume d'isopropanol a été ajouté et laissé 5 minutes à température ambiante. Une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 mn a ensuite été réalisée. Le surnageant a été évacué et 50 µL d'éthanol 70% refroidi ont été ajoutés. La dernière centrifugation a été programmée à 13000 rpm pendant 10 mn. L'éthanol a été évaporé quelques minutes au speed vac et 25 µL de TE ont été ajoutés au produit restant. L'ADN a ensuite pu être dosé au Qbit.

3.1.2 Extractions d'ADN de feuilles de vigne

La procédure recommandée par le Kit DNeasy de Qiagen a été modifiée pour l'extraction d'ADN génomique de feuilles de vigne. La vigne étant une plante riche en composés phénoliques qui interagissent avec les acides nucléiques, le protocole fourni par le kit a été adapté en modifiant le tampon de lyse (**Tableau 14**). Pour 100 mg de tissus broyés, 600 µL de tampon de lyse sont ajoutés. Cette solution est vortexée, 60 µL de sarkosyl 20% y sont ajoutés, et l'ensemble est ensuite incubé 10 mn à 70°C. Le reste de la procédure est ensuite réalisé selon les recommandations du fournisseur.

Tableau 15 : Composition du tampon d'extraction d'ARNs de baies

Composé	Concentration (mM)
CTAB	2%
PVP-40	2%
Tris	100 mM pH8
NaCl	2 M
EDTA	25 mM pH7.5

3.2 Extractions d'ARN

3.2.1 Extraction d'ARN de feuilles de vigne

La procédure recommandée par le Kit RNeasy de Qiagen a été modifiée de la même manière que pour l'extraction d'ADN. Le reste de la procédure est ensuite réalisé selon les recommandations du fournisseur.

3.2.2 Extraction d'ARN des baies

Du fait des fortes concentrations en polyphénols dans les baies, les extractions d'ARN par kit ne sont pas adaptées. Le protocole suivi a donc été le suivant.

Les baies ont été broyées à l'aide d'un broyeur à bille (Fristch). La poudre obtenue a été pesée et 1 g a été transféré dans un tube de 50 mL (Falcon). 15 mL de tampon d'extraction (**Tableau 15**) et 300 µL de β -mercaptoethanol y ont été ajoutés. L'ensemble a été vortexé pendant 1 mn. Le tube a été incubé 10 mn à 65°C et agité toutes les 2 mn. Il a ensuite été centrifugé 15 mn à 6000 rpm à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Falcon. Un volume identique de mélange chloroforme : alcool iso amylique (24 :1) a été ajouté. Le tube a été vortexé 2 mn, puis centrifugé 15 mn à 6500 rpm. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube Falcon et un volume identique du mélange chloroforme : alcool iso amylique a été ajouté. Le tube a été vortexé et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. La phase aqueuse a été récupérée et 0,1 volume d'acétate de sodium (3M pH 5,2) et 0,6 volume d'isopropanol ont été ajoutés. L'ensemble a été mélangé par inversion, puis placé 30 mn à -80°C. L'échantillon a ensuite été centrifugé 30 mn à 9000 rpm. Le surnageant a été éliminé par pipetage et le culot a été dissout dans 1 mL de TE (**Tableau 12**). Le tout a été transféré dans un tube de 1,5 mL et 300 µL d'une solution de LiCl 8M a été ajoutée. Le mélange a été réalisé par 3 inversions du tube qui a ensuite été placé une nuit à 4°C. Il a ensuite été centrifugé 30 mn à 13200 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 800 µL d'EtOH 70% préalablement refroidi. Le tube a été centrifugé 20 mn à 13200 rpm, puis, une fois le surnageant retiré, le culot a été séché puis resuspendu avec 44 µL d'eau sans RNase/DNase. L'ARN des baies a ainsi été récupéré, puis dosé.

3.2.3 Extraction d'ARN du mycélium de champignon Ascomycète

Le protocole utilisé pour extraire les ARN totaux a été celui fourni dans le kit Qiagen.

3.3 Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques ont été dosés avec les réactifs et l'appareil Qbit (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

3.4 Traitement DNase des ARN extraits

Le traitement DNase des échantillons a été réalisé à l'aide du kit Fermentas Deoxyribonuclease I. Le traitement a été fait à partir d'environ 2 µg d'ARN auquel ont été ajoutés 2 µL de tampon et 2 µL de DNase dans un volume total de 20 µL. Après une incubation de 30 mn à 37°C, 2 µL d'EDTA ont été ajoutés, puis l'échantillon a été incubé 10 mn à 65°C.

3.5 Transcription inverse

La RT-PCR (kit Invitrogen) a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN auquel ont été ajoutés 1 µL d'oligo dT 10mM et 1 µL de dNTPs 10mM. Le mélange a été incubé 5 mn à 65°C, puis 4 µL de Buffer 5X, 2 µL de DTT 0.1M et 1 µL de RNase OUT ont été ajoutés. L'ensemble a été incubé à 42°C pendant 2 mn, puis 1 µL de Superscript II RT a été ajouté. Une incubation de 50 mn à 42°C, suivie de 15 mn à 72°C a permis d'obtenir des ADNc. Le volume final était de 20 µL.

3.6 PCR, iPCR, Race PCR

3.6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les PCR ont été réalisées avec environ 15 ng de matrice pour 25 µL de volume réactionnel. Des volumes de 0,5 µL de chaque amorce à 10 µM du gène à amplifier ont été ajoutés. Selon la Taq utilisée (Recombinant Polymerase d'Invitrogen pour les vérifications et Platinum Pfx DNA polymérase d'Invitrogen pour le séquençage), les volumes de Taq et de Buffer ont été ajustés selon les recommandations du fournisseur. La concentration finale en MgCl₂ était de 2,5 mM. De l'eau sans DNase/ RNase a été ajoutée pour compléter le volume réactionnel à 25µL.

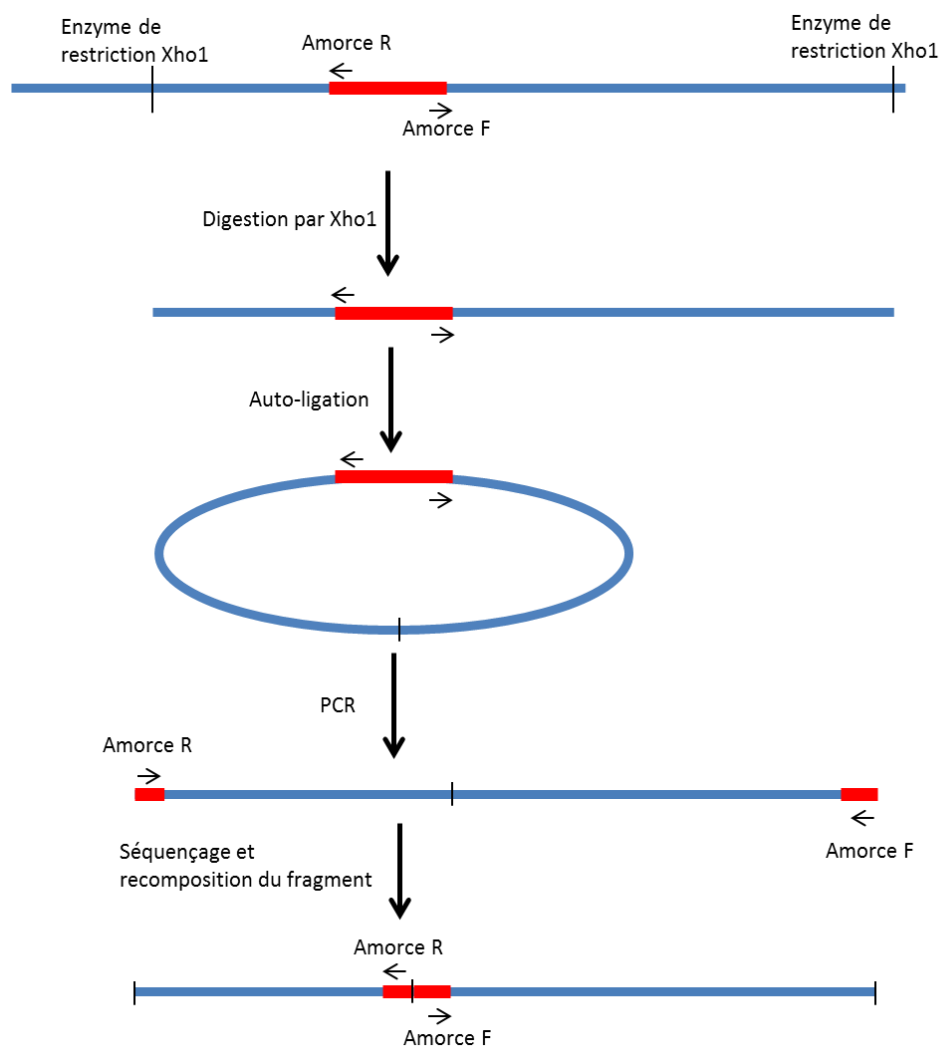


Figure 55 : Principe de la PCR inverse

Le mélange a ensuite été placé dans un thermocycleur selon le programme suivant:

- Dénaturation initiale : 94°C pendant 3 min
- Dénaturation : 94° pendant 30 s
- Hybridation : à la température d'hybridation des amorces pendant 30 s
- Elongation : 72°C pendant 1 mn/kb
- Elongation finale : 72°C pendant 10 min

Les cycles de la dénaturation à l'élongation ont été répétés 25 à 35 fois.

3.6.2 PCR inverse (iPCR)

La technique de la iPCR a été utilisée pour identifier la séquence de gènes inconnus en complément de la RACE-PCR lorsque cette dernière n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Le principe de cette méthode basée sur l'ADN est de pouvoir réaliser une PCR dirigée vers les extrémités d'un fragment, connaissant la séquence de ce fragment. Elle repose sur la cyclisation et l'amplification de parties d'ADN digérées de part et d'autre du fragment dont la séquence est connue (**Figure 57**).

La première étape est la digestion de l'ADN par une enzyme ne coupant pas le fragment connu. Dans notre cas, elle a été réalisée par l'enzyme Xho1 (Invitrogen). Une quantité d'1 µg d'ADN a été digérée par 10 unités d'enzyme. Un volume de 2 µL de tampon adapté à l'enzyme et un volume d'eau permettant d'obtenir un volume final de 20 µL ont été ajoutés. La digestion a été réalisée pendant une nuit à 37°C.

La purification de 16 µL du produit de digestion a été réalisée par ajout de 84 µL d'eau et 100 µL d'un mélange CHCl₃ : IAA (24 :1). Le mélange a été vortexé et centrifugé 5 mn à 15000 rpm. La phase aqueuse (supérieure) a été transférée dans un nouveau tube. A cette phase ont été ajoutés 0,1 volume de NaOAc (3 M) et 2,5 volumes de EtOH pur. L'ensemble a été maintenu au congélateur à -80°C pendant 30 mn puis centrifugé 20 mn à 15000 rpm à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot lavé avec 500 µL d'EtOH 70% sans être resuspendu. Une fois le solvant éliminé, le culot a été resuspendu dans 44 µL d'eau.

La ligation des fragments digérés a été réalisée en procédant au mélange suivant: 17,5 µL d'ADN digéré, 0,5 µL de ligase (Biolabs, 400 000 U/ml) et 2 µL de tampon adapté à l'enzyme. L'ensemble a été incubé une nuit à 16°C. Une inactivation de 10 mn à 65°C a permis de stopper la ligation.

L'amplification des extrémités digérées de part et d'autre du fragment connu a été réalisée par une PCR classique.

3.6.3 Race PCR

Cette méthode a été utilisée pour amplifier un gène codant pour une β -glucosidase candidate dont seulement un fragment a été identifié chez *D. seriata*. L'amplification est basée sur l'ADNc, elle a été réalisée sur les deux extrémités 5' et 3' par RACE-PCR avec le kit 5'/3' RACE Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Allemagne) selon les indications du fournisseur.

3.7 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La PCR en temps réel repose sur la détection, au cours de chaque cycle d'amplification, de la fluorescence émise par un indicateur de la formation des amplicons. L'indicateur utilisé, le SybrGreen, est un fluorophore capable de se lier à l'ADN et d'émettre une fluorescence uniquement lorsqu'il est intégré dans l'ADN double brin. Le système optique couplé au thermocycleur C1000 Thermal Cycler (Biorad) permet de détecter, à chaque cycle d'amplification, la fluorescence du SybrGreen. Au cours de la phase exponentielle de PCR, la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons formés, mais est également corrélée à la quantité de matrice cible initiale. Les données de fluorescence sont transmises au logiciel CFX Manager (Biorad) qui détermine un cycle « seuil », Ct (Threshold Cycle), pour lequel le signal fluorescent émis est supérieur au bruit de fond. Le Ct sera donc d'autant plus faible que la quantité de matrice cible initiale sera élevée.

Dans chaque puits ont été déposés 5 μ L de produit de transcription inverse dilué (soit l'équivalent de 10 ng d'ARN totaux), 12,5 μ L de SybrGreen Supermix (Biorad) et 200 nM de chaque amorce, pour un volume final de 25 μ L. Chaque réaction a été réalisée en triplicats. Pour chaque plaque, un témoin sans matrice ainsi qu'une gamme étalon de la matrice cible ont été déposés. Pour établir la gamme étalon de chaque fragment cible, celui-ci a été amplifié par PCR puis dosé par spectrophotométrie (Nanodrop). Le nombre de chaque nucléotide a permis d'établir la masse molaire de l'amplicon ainsi que la concentration de l'amplicon en nombre de copies/ μ L. La gamme étalon a enfin été ajustée par dilution en cascade au 1/10^{ème} pour déposer de 10⁸ à 10² copies. La pente de la droite établie grâce à la gamme étalon a permis de calculer l'efficacité de la PCR : Efficacité (E) = $10^{-1/\text{pente}}$. Celle-ci doit être comprise entre 80 et 100%.

Le programme du thermocycleur utilisé a été le suivant :

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 30 s
- Dénaturation : 94°C pendant 15 s
- Hybridation : 60°C pendant 15 s
- Elongation : 72°C pendant 15 s
- Acquisition fluorescence : 73°C ou 78°C pendant 10 s (40 cycles)
- Courbe de fusion : de 55°C à 95°C, pas de 0,5°C toutes les 10 s.

La courbe de fusion a permis de déterminer le T_m de l'amplicon, de vérifier l'absence d'amplification non spécifique et lors des premiers essais, de fixer la température d'acquisition afin d'éviter de prendre en compte la fluorescence émise par d'éventuels dimères formés par les amorces. Les températures d'acquisition étaient de 73°C pour les gènes *VvBAS5*, *VvBAS6* et *VvEF1 α* et de 78°C pour *VvBAS3*, *VvBAS7.2*, *VvBAS10* et *VvActine*.

Les résultats de PCR en temps réel ont été analysés selon la méthode décrite par Pfaffl (2001), selon la formule indiquée ci-dessous. L'expression de chaque gène d'intérêt (GI) dans un échantillon (éch) a été normalisée par rapport aux gènes de référence (REF) dont l'expression ne varie pas selon les conditions extérieures et aussi par rapport au témoin (t) au même point de cinétique, afin d'obtenir le taux d'expression relatif de chaque GI entre les deux conditions étudiées. Le calcul tient compte de l'efficacité (E) de PCR qui peut varier d'un gène à l'autre. Le ΔCT correspond à la différence entre le cycle seuil pour la condition témoin et le cycle seuil pour l'échantillon. Pour chaque échantillon, la qPCR a été réalisée au moins deux fois et les produits de qPCR ont été séquencés afin de vérifier que le bon fragment était amplifié.

$$\text{Taux d'expression relatif} = \frac{(1+E_{GI})^{\Delta CT(\text{éch-t})}}{\sqrt{[(1+E_{REF1})^{\Delta CT(\text{éch-t})} * (1+E_{REF1})^{\Delta CT(\text{éch-t})}]}}$$

3.8 TA-cloning[®], transformations et minipréparations

Le vecteur pCR2.1 (Invitrogen) est un vecteur de clonage de fragment PCR de type TA. Il possède les gènes conférant la résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Il possède, au niveau des extrémités 3', un nucléotide T supplémentaire qui permet de cloner les fragments PCR possédant un nucléotide A en 3'. Le clonage s'effectue dans la séquence codant pour le gène *LacZ* permettant un criblage

Tableau 16 : Recette du milieu LB pour 1 L de solution

Composé	Masse (g)
Tryptone	10
Levure	5
NaCl	5
Agar	20

blanc/bleu. Ce criblage blanc-bleu réalisé sur LB (bouillon lysogène, **tableau 16**) + antibiotique + X-Gal, a permis de vérifier si le vecteur pCR2.1 contient le fragment d'intérêt. Il permet de distinguer les bactéries ayant acquis le plasmide recombiné par criblage blanc-bleu.

Les ligations dans le vecteur pCR2.1 ont été réalisées dans un volume total de 10 µL, selon le protocole du fournisseur.

La transformation des bactéries compétentes a été réalisée par ajout de 5 µL de produit de ligation. Le mélange a été incubé 30 minutes dans la glace puis un choc thermique de 90 s à 42°C a été appliqué. L'échantillon a ensuite été à nouveau placé dans la glace. 80µL de bactéries transformées ont été étalés sur milieu LB complémenté en kanamycine (100 mg/mL), le reste du mélange a été étalé sur une autre boîte. Les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C. Certaines colonies blanches ont ensuite été récupérées et placées dans du milieu LB liquide complémenté à la kanamycine. Le milieu a été incubé une nuit à 37°C.

Le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) a été utilisé pour réaliser les minipréparations de plasmides, selon les indications du fournisseur.

3.9 Séparation de fragments d'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1 à 1,5% (p/v)) dans du tampon d'électrophorèse TAE 1X (Tris Acétate EDTA). Les fragments d'ADN ont été révélés après coloration au GelRed (Biotium) sous UV et photographiés par le système Chemidoc XRS+ (BioRad) et traités par le logiciel ImageLab (Biorad). Les fragments d'intérêt ont été extraits du gel à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), selon les indications du fournisseur.

3.10 Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage a été réalisé par la société Genoscreen (Lille) afin de vérifier les séquences des produits PCR utilisés et d'identifier les nouveaux gènes.

Les traductions de séquences nucléiques en séquences protéiques ont été réalisées grâce au site EXPASY (<http://www.expasy.ch/tools/#translate>). Le logiciel BioEdit a permis de vérifier les données de séquençages, le logiciel CLC Sequence Viewer a été utilisé pour réaliser les alignements de séquences et le logiciel ClustalW a permis de construire des arbres phylogénétiques (paramètres par

défaut). Le logiciel Blast (NCBI) a été utilisé pour la recherche, chez d'autres espèces, de séquences présentant des homologues avec nos séquences d'intérêt. Cette analyse a été complétée par l'utilisation de la fonction FGENESH du site Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), un site permettant l'identification de gènes chez les plantes.

4. Analyse statistique des résultats

Les analyses des résultats obtenus pour les tests d'efficacité des saponines sur les champignons des maladies du bois ont été réalisées grâce au logiciel R par ANOVA et réalisation de groupes homogènes par la méthode Newman Keuls.

Les autres analyses ont été réalisées par comparaisons multiples via le test LSD de Fischer $P < 0.05$ grâce au logiciel Statgraphics (StatPoint).

Valorisation des travaux

Publications

Fischer, M., **F. Pensec**, G. Demangeat, S. Farine, J. Chong, M. Ramirez-Suero, F. Mazet, et C. Bertsch. 2011. « Impact of *Quillaja saponaria* saponins on grapevine ecosystem organisms ». *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 197-206.

Pensec, F., A. Marmonier, A. Marchal, S. Gersch, N. Nassr, J. Chong, M. Henry, G. Demangeat, et C. Bertsch. 2013. « *Gypsophila Paniculata* root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of Grapevine fanleaf degeneration ». *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19: 439-445.

Szakiel, A., C. Pączkowski, **F. Pensec**, et C. Bertsch. 2012. « Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids ». *Phytochemistry Reviews*: 1-22.

Posters

F. Pensec, M. Ramírez-Suero, F. Lincker, K. Bergeault, M.J.C. Fischer, G. Demangeat, S. Farine, J. Chong, F. Mazet and C. Bertsch. Janvier 2010. Impact of *Quillaja saponaria* saponins on grapevine ecosystem organisms. Chemillé (France), Saponina Congress.

F. Pensec, A. Marmonier, S. Gersch, N. Nassr, J. Chong, M. Henry, G. Demangeat, et C. Bertsch. Juin 2012. Effet nématocide et impact environnemental de saponines extraites des racines de *Gypsophila paniculata*. Paris (France), 8ème colloque de la Société Française de Phytopathologie.

A. Woźniak, **F. Pensec**, A. Szakiel, C. Pączkowski, and C. Bertsch. October 2012. Triterpenoid content of fruit and leaf cuticular waxes of grape berry *Vitis vinifera* c.v. Riesling and Muscat. Lublin (Poland), 2nd International Conference and Workshop: Plant – the source of research material.

Communications orales

Internationales

F. Pensec, A. Marmonier, A. Marchal, S. Gersch, N. Nassr, J. Chong, M. Henry, G. Demangeat and C. Bertsch. May 2013. "Green" control of nematodes to control grapevine fanleaf virus. Karlsruhe (Germany). 8. Rhein-Wein Symposium: Research for sustainable viticulture.

F. Pensec, A. Marmonier, A. Marchal, S. Gersch, N. Nassr, J. Chong, M. Henry, G. Demangeat and C. Bertsch. August 2013. *Gypsophila paniculata* root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration. Beijing (China), International Congress of Plant pathology.

Grand public

F. Pensec, J. Chong et C. Bertsch. Août 2013. Effet nématocide et impact environnemental de saponines extraites des racines de la gypsophile. Colmar. Foire aux vins.

Bibliographie

- Abdelgaleil, S.A.M, F. Hashinaga, et M. Nakatani. 2005. « Antifungal Activity of Limonoids from *Khaya Ivorensis* ». *Pest Management Science* 61: 186-190.
- Achnine, L., D.V. Huhman, M.A. Farag, L.W. Sumner, J.W. Blount, et R.A. Dixon. 2005. « Genomics-Based Selection and Functional Characterization of Triterpene Glycosyltransferases from the Model Legume *Medicago Truncatula* ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 41: 875-887.
- Adrian, M., P. Jeandet, J. Veneau, L.A. Weston, et R. Bessis. 1997. « Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, against *Botrytis Cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold ». *Journal of Chemical Ecology* 23: 1689-1702.
- Agrell, J., P. Anderson, W. Oleszek, A. Stochmal, et C. Agrell. 2004. « Combined effects of elevated CO₂ and herbivore damage on alfalfa and cotton ». *Journal of Chemical Ecology* 30: 2309-2324.
- Agrell, J., W. Oleszek, A. Stochmal, M. Olsen, et P. Anderson. 2003. « Herbivore-induced responses in alfalfa (*Medicago sativa*) ». *Journal of Chemical Ecology* 29: 303-320.
- American Society for Microbiology. 2005. « Raisins as a functional food for oral health ». *ScienceDaily*: En ligne : <http://www.sciencedaily.com/releases/2005/06/050613062724.htm>.
- Andolfi, A., L. Mugnai, J. Luque, G. Surico, A. Cimmino, et A. Evidente. 2011. « Phytotoxins produced by fungi associated with Grapevine trunk diseases ». *Toxins* 3: 1569-1605.
- Andret-Link, P., C. Laporte, L. Valat, C. Ritzenthaler, G. Demangeat, E. Vigne, V. Laval, P. Pfeiffer, C. Stussi-Garaud, et M. Fuchs. 2004. « Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry ». *Journal of Plant Pathology* 86: 183-195.
- Arfaoui, A., A. El Hadrami, Y. Mabrouk, B. Sifi, A. Boudabous, I. El Hadrami, F. Daayf, et M. Chérif. 2007. « Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* ». *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 470-479.
- Argentieri, M. P., T. D'Addabbo, A. Tava, A. Agostinelli, M. Jurzysta, et P. Avato. 2008. « Evaluation of nematocidal properties of saponins from *Medicago* spp. » *European Journal of Plant Pathology* 120: 189-197.
- Armah, C.N., A.R. Mackie, C. Roy, K. Price, A.E. Osbourn, P. Bowyer, et S. Ladha. 1999. « The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol ». *Biophysical Journal* 76: 281-290.
- Arneson, P.A., et R.D. Durbin. 1968. « The sensitivity of fungi to α-tomatine ». *Phytopathology* 58: 536-537.
- Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M.R. Willmann, W.L. Chiu, L. Gomez-Gomez, T. Boller, F.M. Ausubel, et J. Sheen. 2002. « MAP Kinase Signalling Cascade in Arabidopsis Innate Immunity ». *Nature* 415: 977-983.
- Asselbergh, B., K. Curvers, S.C. França, K. Audenaert, M. Vuylsteke, F.V. Breusegem, et M. Höfte. 2007. « Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis ». *Plant Physiology* 144: 1863-1877.
- Aubertot, J., J. Barbier, A. Carpentier, J. Gril, L. Guichard, P. Lucas, S. Savary, I. Savini, et M. Voltz. 2005. « Pesticides, agriculture et environnement - Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux ». *Rapport d'expertise scientifique collective, INRA et Cemagref*.
- Augustin, J.M., V. Kuzina, S.B. Andersen, et S. Bak. 2011. « Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins ». *Phytochemistry* 72: 435-457.

- Aziz, A., B. Poinssot, X. Daire, M. Adrian, A. Bézier, B. Lambert, J.M. Joubert, et A. Pugin. 2003. « Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection against Botrytis Cinerea and Plasmopara Viticola ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 1118-1128.
- Aziz, A., P. Trotel-Aziz, L. Dhuicq, P. Jeandet, M. Couderchet, et G. Vernet. 2006. « Chitosan Oligomers and Copper Sulfate Induce Grapevine Defense Reactions and Resistance to Gray Mold and Downy Mildew ». *Phytopathology* 96: 1188-1194.
- Baggiolini, M. 1952. « Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique ». *Revue romande d'agriculture et d'arboriculture* 8: 4-6.
- Bangham, A.D., R.W. Horne, A.M. Glauert, J.T. Dingle, et J.A. Lucy. 1962. « Action of saponin on biological cell membranes ». *Nature* 196: 952-955.
- Barron, Denis. 2011. « Les saponines en agroalimentaire ». In Colloque Saponina, Chemillé (49).
- Batovska, D. I., I. T. Todorova, S. P. Parushev, D. V. Nedelcheva, V. S. Bankova, S. S. Popov, I. I. Ivanova, et S. A. Batovski. 2009. « Biomarkers for the prediction of the resistance and susceptibility of grapevine leaves to downy mildew ». *Journal of Plant Physiology* 166: 781-785.
- Batovska, D. I., I. T. Todorova, et S. S. Popov. 2009. « Seasonal variations in the leaf surface composition of field grown grapevine plants ». *Journal of Serbian Chemical Society* 74: 1229-1240.
- Bavaresco, L., E. Cantu, M. Fregoni, et M. Trevisan. 1997. « Constitutive Stilbene Contents of Grapevine Cluster Stems as Potential Source of Resveratrol in Wine ». *Vitis* 36: 115-118.
- Bavaresco, L., C. Fregoni, E. Cantù, et M. Trevisan. 1999. « Stilbene Compounds: From the Grapevine to Wine ». *Drugs under Experimental and Clinical Research* 25: 57-63.
- Becker, H., J.M. Scher, J.B. Speakman, et J. Zapp. 2005. « Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria* ». *Fitoterapia* 76: 580-584.
- Bede, J.C., R.O. Musser, G.W. Felton, et K.L. Korth. 2006. « Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis ». *Plant Molecular Biology* 60: 519-531.
- Bednarek, P., M. Pislewski-Bednarek, A. Svatos, B. Schneider, J. Doubsky, M. Mansurova, M. Humphry, et al. 2009. « A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense ». *Science* 323: 101-106.
- Benhamou, N., G. le Floch, J. Vallance, J. Gerbore, D. Grizard, et P. Rey. 2012. « *Pythium Oligandrum*: An Example of Opportunistic Success ». *Microbiology* 158: 2679-2694.
- Bennick, A. 2002. « Interaction of Plant Polyphenols with Salivary Proteins ». *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 13: 184-196.
- Bergeault, K., C. Bertsch, D. Merdinoglu, et B. Walter. 2010. « Low Level of Polymorphism in Two Putative NPR1 Homologs in the Vitaceae Family ». *Biology Direct* 5: 9.
- Bertsch, C., P. Larignon, S. Farine, C. Clément, et F. Fontaine. 2009. « The Spread of Grapevine Trunk Disease ». *Science* 324: 721.
- Bertsch, C., M. Ramirez-Suero, M. Magnin-Robert, J. Chong, E. Abou-Mansour, A. Spagnolo, C. Clément, et F. Fontaine. 2012. « Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood ». *Plant Pathology* 62: 243-265.
- Bézier, A., B. Lambert, et F. Baillieul. 2002. « Study of Defense-Related Gene Expression in Grapevine Leaves and Berries Infected with Botrytis Cinerea ». *European Journal of Plant Pathology* 108: 111-120.

- Bianchi, G., C. Murelli, et G. Vlahov. 1992. « Surface waxes from olive fruits ». *Phytochemistry* 31: 3503-3506.
- Birch, P.R.J., P.C. Boevink, E.M. Gilroy, I. Hein, L. Pritchard, et S.C. Whisson. 2008. « Oomycete RXLR Effectors: Delivery, Functional Redundancy and Durable Disease Resistance ». *Current Opinion in Plant Biology* 11: 373-379.
- Blanc, S., S. Wiedemann-Merdinoglu, V. Dumas, P. Mestre, et D. Merdinoglu. 2012. « A Reference Genetic Map of Muscadinia Rotundifolia and Identification of Ren5, a New Major Locus for Resistance to Grapevine Powdery Mildew ». *Theoretical and Applied Genetics* 125: 1663-1675.
- Blasi, P., S. Blanc, S. Wiedemann-Merdinoglu, E. Prado, E.H. Rühl, P. Mestre, et D. Merdinoglu. 2011. « Construction of a Reference Linkage Map of Vitis Amurensis and Genetic Mapping of Rpv8, a Locus Conferring Resistance to Grapevine Downy Mildew ». *Theoretical and Applied Genetics* 123: 43-53.
- Blouin, J. 2007. *Les parasites de la vigne : stratégies de protection raisonnée*. Dunod. Paris.
- Boso, S., et H.H. Kassemayer. 2008. « Different Susceptibility of European Grapevine Cultivars for Downy Mildew ». *Vitis* 47: 39-49.
- Bouarab, K., R. Melton, J. Peart, D. Baulcombe, et A. Osbourn. 2002. « A Saponin-Detoxifying Enzyme Mediates Suppression of Plant Defences ». *Nature* 418: 889-892.
- Boubakri, H., M.A. Wahab, J. Chong, C. Bertsch, A. Mliki, et I. Soustre-Gacougnolle. 2012. « Thiamine induced resistance to Plasmopara viticola in grapevine and elicited host-defense responses, including HR like-cell death ». *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 120-133.
- Bouquet, A., L. Torregrosa, et P. Chatelet. 2003. « Combinaison des méthodes conventionnelles et biotechnologiques dans la sélection de porte - greffes présentant une résistance durable à la transmission de la maladie du court - noué : (suite et fin) ». *Le Progrès agricole et viticole* 120: 528-532.
- Bowyer, P., B.R. Clarke, P. Lunness, M.J. Daniels, et A.E. Osbourn. 1995. « Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme ». *Science* 267: 371-374.
- Brem, S., D.M. Rast, et H.P. Ruffner. 1986. « Partitioning of Photosynthate in Leaves of Vitis Vinifera Infected with Uncinula Necator or Plasmopora Viticola ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29: 285-291.
- Brendolise, C., Y.K. Yauk, E.D. Eberhard, M. Wang, D. Chagne, C. Andre, D.R. Greenwood, et L.L. Beuning. 2011. « An Unusual Plant Triterpene Synthase with Predominant A-Amyrin-Producing Activity Identified by Characterizing Oxidosqualene Cyclases from Malus × Domestica ». *The FEBS Journal* 278: 2485-2499.
- Brisson, L. F., R. Tenhaken, et C. Lamb. 1994. « Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. » *The Plant Cell Online* 6: 1703-1712.
- Broekaert, W.F., S.L. Delauré, M.F.C. De Bolle, et B.P.A. Cammue. 2006. « The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions ». *Annual Review of Phytopathology* 44: 393-416.
- Brown, I., J. Trethowan, M. Kerry, J. Mansfield, et G. P. Bolwell. 1998. « Localization of Components of the Oxidative Cross-Linking of Glycoproteins and of Callose Synthesis in Papillae Formed during the Interaction between Non-Pathogenic Strains of Xanthomonas Campestris and French Bean Mesophyll Cells ». *The Plant Journal* 15: 333-343.

- Bruez, E. 2013. « Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'Esca ». *Thèse doctorale*.
- Bruez, E., P. Lecomte, J. Grosman, B. Doublet, C. Bertsch, F. Fontaine, A. Ugaglia, P.L. Teissedre, L. Guerin-Dubranan, et P. Rey. 2013. « Overview of the evolution of grapevine trunk diseases in France in the early 2000s ». *Phytopathologia mediterranea* Sous presse.
- Bruneton, J. 1999. *Pharmacognosie: Phytochimie, plantes médicinales*. 3e éd. rev. Tech & Doc / Lavoisier.
- Bryant, J.P., G.D. Wieland, P.B. Reichardt, V.E. Lewis, et M.C. McCarthy. 1983. « Pinosylvin Methyl Ether Deters Snowshoe Hare Feeding on Green Alder ». *Science* 222: 1023-1025.
- Buschhaus, C., et R. Jetter. 2012. « Composition and physiological function of the wax layers coating Arabidopsis leaves: β -amyrin negatively affects the intracuticular water barrier ». *Plant Physiology* 160: 1120-1129.
- Camareri, M., M.F. Consiglio, P. Pecchia, G. Corea, V. Lanzotti, J.I. Ibeas, A. Tava, et C. Conicella. 2008. « Molecular characterization of β -amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis ». *Plant Science* 175: 255-261.
- Carelli, M., E. Biazzi, F. Panara, A. Tava, L. Scaramelli, A. Porceddu, N. Graham, et al. 2011. « *Medicago Truncatula* CYP716A12 Is a Multifunctional Oxidase Involved in the Biosynthesis of Hemolytic Saponins ». *The Plant Cell* 23: 3070-3081.
- Carter, J.P., J. Spink, P.F. Cannon, M.J. Daniels, et A.E. Osbourn. 1999. « Isolation, characterization, and avenacin sensitivity of a diverse collection of cereal-root-colonizing fungi ». *Applied Environmental Microbiology* 65: 3364-3372.
- Chan, A.C., D. Ager, et I.P. Thompson. 2013. « Resolving the Mechanism of Bacterial Inhibition by Plant Secondary Metabolites Employing a Combination of Whole-Cell Biosensors ». *Journal of Microbiological Methods* 93: 209-217.
- Chang, X., E. Heene, F. Qiao, et P. Nick. 2011. « The Phytoalexin Resveratrol Regulates the Initiation of Hypersensitive Cell Death in *Vitis* Cell ». *PLoS ONE* 6: e26405.
- Chapagain, B.P., et Z. Wiesman. 2006. « Phyto-saponins as a natural adjuvant for delivery of agromaterials through plant cuticle membranes ». *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 6277-6285.
- Chappell, J. 2002. « The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami ». *Current Opinion in Plant Biology* 5: 151-157.
- Cheng, Y., H. Zhang, J. Yao, X. Wang, J. Xu, Q. Han, G. Wei, L. Huang, et Z. Kang. 2012. « Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen ». *BMC Plant Biology* 12: 96.
- Chong, J., R. Baltz, C. Schmitt, R. Beffa, B. Fritig, et P. Saindrenan. 2002. « Downregulation of a Pathogen-Responsive Tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid Glucosyltransferase Reduces Scopoletin Glucoside Accumulation, Enhances Oxidative Stress, and Weakens Virus Resistance ». *The Plant Cell* 14: 1093-1107.
- Chong, J., A. Poutaraud, et P. Huguency. 2009. « Metabolism and roles of stilbenes in plants ». *Plant Science* 177: 143-155.
- Choudhary, D.K., A. Prakash, et B. N. Johri. 2007. « Induced Systemic Resistance (ISR) in Plants: Mechanism of Action ». *Indian Journal of Microbiology* 47: 289-297.
- Chung, E., Ch-W. Cho, K.-Y. Kim, J. Chung, J.-I. Kim, Y.-S. Chung, K. Fukui, et J.-H. Lee. 2007. « Molecular Characterization of the GmAMS1 Gene Encoding B-Amyrin Synthase in Soybean Plants ». *Russian Journal of Plant Physiology* 54: 518-523.

- Collmer, A., D.J. Schneider, et M. Lindeberg. 2009. « Lifestyles of the effector rich: genome-enabled characterization of bacterial plant pathogens ». *Plant Physiology* 150: 1623-1630.
- Commenil, P., L. Brunet, et J.C. Audran. 1997. « The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease ». *Journal of Experimental Botany* 48: 1599 - 1607.
- Confalonieri, M., M. Cammareri, E. Biazzi, P. Pecchia, M.P. S.a Fevereiro, A. Balestrazzi, A. Tava, et C. Conicella. 2009. « Enhanced Triterpene Saponin Biosynthesis and Root Nodulation in Transgenic Barrel Medic (Medicago Truncatula Gaertn.) Expressing a Novel Beta-Amyrin Synthase (AsOXA1) Gene ». *Plant Biotechnology Journal* 7: 172 - 182.
- Costet, L., S. Cordelie, S. Dorey, F. Bailleul, B. Fritig, et S. Kauffmann. 1999. « Relationship between Localized Acquired Resistance (LAR) and the Hypersensitive Response (HR) : HR Is Necessary for LAR to Occur and Salicylic Acid Is Not Sufficient to Trigger LAR ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 655 - 662.
- Coutos-Thévenot, P., B. Poinssot, A. Bonomelli, H. Yean, C. Breda, D. Buffard, R. Esnault, R. Hain, et M. Boulay. 2001. « In Vitro Tolerance to Botrytis Cinerea of Grapevine 41B Rootstock in Transgenic Plants Expressing the Stilbene Synthase Vst1 Gene under the Control of a Pathogen-Inducible PR 10 Promoter ». *Journal of Experimental Botany* 52: 901-910.
- Crous, P.W., et W. Gams. 2000. « Phaeomoniella Chlamydospora Gen. et Comb. Nov., a Causal Organism of Petri Grapevine Decline and Esca ». *Phytopathologia Mediterranea* 39: 112-118.
- D'Addabbo, T., T. Carbonara, P. Leonetti, V. Radicci, A. Tava, et P. Avato. 2011. « Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from Medicago sativa ». *Phytochemistry Reviews* 10: 503-519.
- Dagostin, S., H.J. Schärer, I. Pertot, et L. Tamm. 2011. « Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? ». *Crop Protection* 30: 776 - 788.
- Dandekar, A.M., H. Gouran, A.M. Ibáñez, S.L. Uratsu, C.B. Agüero, S. McFarland, Y. Borhani, et al. 2012. « An engineered innate immune defense protects grapevines from Pierce disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 3721-3725.
- Darriet, P., M. Pons, R. Henry, O. Dumont, V. Findeling, P. Cartolaro, A. Calonnet, et D. Dubourdieu. 2002. « Impact Odorants Contributing to the Fungus Type Aroma from Grape Berries Contaminated by Powdery Mildew (Uncinula Necator); Incidence of Enzymatic Activities of the Yeast Saccharomyces Cerevisiae ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3277-3282.
- Delaunoy, B., G. Farace, P. Jeandet, C. Clément, F. Baillieul, S. Dorey, et S. Cordelie. 2013. « Elicitors as Alternative Strategy to Pesticides in Grapevine? Current Knowledge on Their Mode of Action from Controlled Conditions to Vineyard ». *Environmental Science and Pollution Research International* Sous presse.
- Demangeat, G., R. Voisin, J. C. Minot, N. Bosselut, M. Fuchs, et D. Esmenjaud. 2005. « Survival of Xiphinema index in vineyard soil and retention of Grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants ». *Phytopathology* 95: 1151-1156.
- Dempsey, D.M. A., et D.F. Klessig. 2012. « SOS – too many signals for systemic acquired resistance? ». *Trends in Plant Science* 17: 538-545.

- Deytieux-Belleau, C., L. Geny, J. Roudet, V. Mayet, B. Donèche, et M. Fermaud. 2009. « Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea* ». *Eur J Plant Pathol* 125: 551-563.
- Direction générale de l'alimentation. 2005. « Stratégie de protection pour une utilisation raisonnée et durable des intrants phytosanitaires en viticulture ». *Guide pour une protection durable de la vigne*.
- Directive 2009/128/CE. 2009. « Directive 2009/128/CE du parlement européen et du conseil du 21 octobre 2009 instaurant un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable ». *Journal officiel de l'Union Européenne*.
- Dixon, R.A. 2001. « Natural Products and Plant Disease Resistance ». *Nature* 411: 843-847.
- Dixon, R.A., et N.L. Paiva. 1995. « Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. » *The Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dorey, S., F. Bailleul, M.-A. Pierrel, P. Saindrenan, B. Fritig, et S. Kauffmann. 1997. « Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 646-655.
- Doster, M.A., et W.C. Schnathorst. 1985. « Comparative susceptibility of various grapevine cultivars to the powdery mildew fungus *Uncinula necator* ». *American Journal of Enology and Viticulture* 36: 101-104.
- Dubos, B. 2002. « Les maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne ». *Féret*: 200.
- Durrant, W. E., et X. Dong. 2004. « Systemic Acquired Resistance ». *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.
- Edreva, A., V. Velikova, T. Tsonev, S. Dagnon, A. Gürel, L. Aktas, et E. Gesheva. 2008. « Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms ». *General and Applied Plant Physiology* 34: 67-78.
- Edwards, J., I.G. Pascoe, S. Salib, et N. Laukart. 2004. « Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines ». *Phytopathologia Mediterranea* 43: 158.
- Ehrling, J., B. Hamberger, R. Million-Rousseau, et D. Werck-Reichhart. 2006. « Cytochromes P450 in Phenolic Metabolism ». *Phytochemistry Reviews* 5: 239-270.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, et N. Delen. 2004. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer.
- Elmer, P.A.G., et T. Reglinski. 2006. « Biosuppression of *Botrytis Cinerea* in Grapes ». *Plant Pathology* 55: 155-177.
- Esmenjaud, D., et A. Bouquet. 2009. « Selection and application of resistant germplasm for grapevine nematodes management ». In *Integrated management of fruit crops and forest nematodes*, édité par A. Ciancio et K.G. Mukerji, 4:195-214. Springer Science: Netherlands.
- European Commission. 2007. « Council Decision of 20 September 2007 concerning the no inclusion of 1,3-dichloropropene in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance (notified under document number C(2007) 4281) ». *Official Journal of the European Union* L249: 11-13.
- Fasoli, M., S. Dal Santo, S. Zenoni, G.B. Tornielli, L. Farina, A. Zamboni, A. Porceddu, et al. 2012. « The Grapevine Expression Atlas Reveals a Deep Transcriptome Shift Driving the Entire Plant into a Maturation Program ». *The Plant Cell* 24 (9): 3489-3505.

- Feliciano, A.J., et W.D. Gubler. 2001. « Histological Investigations on Infection of Grape Roots and Shoots by «Phaeoacremonium» Spp. » *Phytopathologia Mediterranea* 40: 387-393.
- Ferrer, J.L., J.M. Jez, M.E. Bowman, R.A. Dixon, et J.P. Noel. 1999. « Structure of Chalcone Synthase and the Molecular Basis of Plant Polyketide Biosynthesis ». *Nature Structural Biology* 6: 775-784.
- Fischer, D., C. Imholt, H.J. Pelz, M. Wink, A. Prokop, et J. Jacob. 2013. « The Repelling Effect of Plant Secondary Metabolites on Water Voles, *Arvicola Amphibius* ». *Pest Management Science* 69: 437-443.
- Fischer, M., F. Pensec, G. Demangeat, S. Farine, J. Chong, M. Ramirez-Suero, F. Mazet, et C. Bertsch. 2011. « Impact of Quillaja saponaria saponins on grapevine ecosystem organisms ». *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 197-206.
- Fonseca, S., A. Chini, M. Hamberg, B. Adie, A. Porzel, R. Kramell, O. Miersch, C. Wasternack, et R. Solano. 2009. « (+)-7-Iso-Jasmonoyl-L-Isoleucine Is the Endogenous Bioactive Jasmonate ». *Nature Chemical Biology* 5: 344-350.
- Foyer, C.H., et G. Noctor. 2005. « Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses ». *The Plant Cell Online* 17: 1866-1875.
- Francis, G., Z. Kerem, H.P.S. Makkar, et K. Becker. 2002. « The biological action of saponins in animal systems: a review ». *British Journal of Nutrition* 88: 587-605.
- Frankel, E.N., J.B. German, J.E. Kinsella, E. Parks, et J. Kanner. 1993. « Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine ». *The Lancet* 341: 454-457.
- Fuchs, M. 2008. « Les plantes transgéniques et la lutte contre les virus phytopathogènes : état de l'art et perspectives ». *Virologie* 12: 27-37.
- Fuchs, M., M. Pinck, M.A. Serghini, M. Ravelonandro, B. Walter, et L. Pinck. 1989. « The Nucleotide Sequence of Satellite RNA in Grapevine Fanleaf Virus, Strain F13 ». *The Journal of General Virology* 70: 955-962.
- Fukushima, E.O., H. Seki, K. Ohyama, E. Ono, N. Umemoto, M. Mizutani, K. Saito, et T. Muranaka. 2011. « CYP716A Subfamily Members Are Multifunctional Oxidases in Triterpenoid Biosynthesis ». *Plant & Cell Physiology* 52: 2050-2061.
- Fussler, L., N. Kobes, F. Bertrand, M. Maumy, J. Grosman, et S. Savary. 2008. « A Characterization of Grapevine Trunk Diseases in France from Data Generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey ». *Phytopathology* 98: 571-579.
- Gadjev, I., J.M. Stone, et T.S. Gechev. 2008. « Programmed Cell Death in Plants: New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide ». *International Review of Cell and Molecular Biology* 270: 87-144.
- Gadoury, D.M., R.C. Seem, R.C. Pearson, W.F. Wilcox, et R.M. Dunst. 2001. « Effects of powdery mildew on vine growth, yield, and quality of concord grapes ». *Plant Disease* 85: 137-140.
- Galet, P. 1999. *Précis de pathologie viticole - 3ème édition*. France: Pierre Galet.
- Gambino, G., I. Perrone, A. Carra, W. Chitarra, P. Boccacci, D. Torello Marinoni, M. Barberis, F. Maghuly, M. Laimer, et I. Gribaudo. 2010. « Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation ». *Transgenic Research* 19: 17-27.
- Gerbore, J., E. Bruez, J. Vallance, D. Grizard, C. Regnault-Roger, et P. Rey. 2011. « Protection against a vine trunk attack by *Phaeomoniella chlamydospora* is

- concomitant with root colonization by the oomycete *Pythium oligandrum* ». *IOBC/wprs Bulletin* 71.
- Gessler, C., I. Pertot, et M. Perazzoli. 2011. « *Plasmopara Viticola* : A Review of Knowledge on Downy Mildew of Grapevine and Effective Disease Management ». *Phytopathologia Mediterranea* 50: 3-44.
- Giacomelli, L., V. Nanni, L. Lenzi, J. Zhuang, M. Dalla Serra, M.J. Banfield, C.D. Town, K.A.T. Silverstein, E. Baraldi, et C. Moser. 2012. « Identification and Characterization of the Defensin-like Gene Family of Grapevine ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1118-1131.
- Gil, M., M. Pontin, F. Berli, R. Bottini, et P. Piccoli. 2012. « Metabolism of Terpenes in the Response of Grape (*Vitis Vinifera* L.) Leaf Tissues to UV-B Radiation ». *Phytochemistry* 77: 89-98.
- Glazebrook, J. 2005. « Contrasting Mechanisms of Defense against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens ». *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- Goodwin, R. H., et B. M. Pollock. 1954. « Studies on roots. I. Properties and distribution of fluorescent constituents in *Avena* roots ». *American Journal of Botany* 41: 516-520.
- Grosman, J., et B. Doublet. 2012. « Maladies du bois de la vigne ». *Phytoma* 651: 31-35.
- Guo, S., et L. Kenne. 2000. « Characterization of some O-acetylated saponins from *Quillaja saponaria* Molina ». *Phytochemistry* 54: 615-23.
- Hahlbrock, K., D. Scheel, E. Logemann, T. Nürnberger, M. Parniske, S. Reinold, W. R. Sacks, et E. Schmelzer. 1995. « Oligopeptide Elicitor-Mediated Defense Gene Activation in Cultured Parsley Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4150-4157.
- Hain, R., H.J. Reif, E. Krause, R. Langebartels, H. Kindl, B. Vornam, W. Wiese, et al. 1993. « Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant ». *Nature* 361: 153.
- Hamiduzzaman, M.M., G. Jakab, L. Barnavon, J.M. Neuhaus, et B. Mauch-Mani. 2005. « Beta-Aminobutyric Acid-Induced Resistance against Downy Mildew in Grapevine Acts through the Potentiation of Callose Formation and Jasmonic Acid Signaling ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 819-829.
- Harborne, J.B. 1999. « The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants ». *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 335-367.
- He, X.Z., et R.A. Dixon. 2000. « Genetic Manipulation of Isoflavone 7-O-Methyltransferase Enhances Biosynthesis of 4'-O-Methylated Isoflavonoid Phytoalexins and Disease Resistance in Alfalfa ». *The Plant Cell* 12: 1689-1702.
- Hemmer, C., E. Vigne, V. Goldschmidt, V. Komar, A. Marmonier, L. Valat, G. Demangeat, S. Vigneron, J.E. Masson, et O. Lemaire. 2009. « Transgenic rootstocks expressing GFLV coat protein gene in a three year field trial: resistance assessment, impact on GFLV diversity and exchange between rootstocks and scions ». *Extended Abstracts, 16th Meeting of ICGV, Dijon, France*: 228-229.
- Henry, M. 2011. « Origin, biosynthesis and characterisation of the saponins ». In *Colloque Saponina*, Chemillé (49).
- Herrmann, K.M. 1995. « The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism ». *Plant Physiology* 107: 7-12.
- Hostettmann, K., et A. Martson. 1995. *Saponins*. Cambridge University Press.
- Hu, X., et A.S.N. Reddy. 1997. « Cloning and Expression of a PR5-like Protein from *Arabidopsis*: Inhibition of Fungal Growth by Bacterially Expressed Protein ». *Plant Molecular Biology* 34: 949-959.

- Hückelhoven, R. 2007. « Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility ». *Annual Review of Phytopathology* 45: 101-127.
- Husselstein-Muller, T., H. Schaller, et P. Benveniste. 2001. « Molecular Cloning and Expression in Yeast of 2,3-Oxidosqualene-Triterpenoid Cyclases from *Arabidopsis thaliana* ». *Plant Molecular Biology* 45: 75-92.
- Jaillon, O., Jean-Marc Aury, Benjamin Noel, Alberto Policriti, Christian Clepet, Alberto Casagrande, Nathalie Choisne, et al. 2007. « The Grapevine Genome Sequence Suggests Ancestral Hexaploidization in Major Angiosperm Phyla ». *Nature* 449 (7161) (septembre 27): 463-467. doi:10.1038/nature06148.
- James, D.G., et J. Whitney. 1993. « Mite Populations on Grapevines in South-Eastern Australia: Implications for Biological Control of Grapevine Mites (Acarina: Tenuipalpidae, Eriophyidae) ». *Experimental & Applied Acarology* 17: 259-270.
- Jarecka, A., A. Saniewska, Z. Bialy, et M. Jurzysta. 2008. « The effect of *Medicago arabica*, *M. hybrida* and *M. sativa* saponins on the growth and development of *Fusarium oxysporum* ». *Acta Agrobotanica* 61: 147-155.
- Jassbi, A.R. 2006. « Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran ». *Phytochemistry* 67: 1977-1984.
- Jeandet, P., A. C. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi, et M. Adrian. 2002. « Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin Gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2731-2741.
- Jelly, N., P. Schellenbaum, B. Walter, et P. Mailliot. 2012. « Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos ». *Transgenic Research* 21: 1319-1327.
- Jones, J. D. G., et J. L. Dangl. 2006. « The plant immune system ». *Nature* 444 (novembre 16): 323.
- Kensil, C.R., J.Y. Wu, C.A. Anderson, D.A. Wheeler, et J. Amsden. 1998. « QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants ». *Les cookies assurent le bon fonctionnement de nos services. En utilisant ces derniers, vous acceptez l'utilisation des cookies. OK En savoir plus Résultats de recherche* *Developments in Biological Standardization* 92: 41-7.
- Kerem, Zohar. 2011. « The use of saponins in livestock farming ». In *Colloque Saponina*, Chemillé (49).
- Kesselmeier, J., et B. Urban. 1983. « Subcellular localization of saponins in green and etiolated leaves and green protoplasts of oat (*Avena sativa* L.) ». *Protoplasma* 114: 133-140. doi:10.1007/BF01279877.
- Kirilov, A., E. Cleiman, S. Toma, P. Kintia, R. Cozmic, A. Scurtul, S. Bastovaya, et O. Kharcu. 2000. « The Influence of Natural Bioregulator Moldstim on Some Physiological Processes of Grape Plants. » *Sodininkystė Ir Daržininkystė* 19: 22-32.
- Klarzynski, O., et B. Fritig. 2001. « Stimulation of plant natural defenses ». *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 324: 953-963.
- Kolodziejczyk-Czepas, J. 2012. « Trifolium Species-Derived Substances and Extracts-- Biological Activity and Prospects for Medicinal Applications ». *Journal of Ethnopharmacology* 143: 14-23.
- Kong, Q., N. Qu, M. Gao, Z. Zhang, X. Ding, F. Yang, Y. Li, et al. 2012. « The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 Kinase Cascade Negatively Regulates Immunity Mediated by a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in *Arabidopsis* ». *The Plant Cell* 24: 2225-2236.

- Kortekamp, A. 2006. « Expression Analysis of Defence-Related Genes in Grapevine Leaves after Inoculation with a Host and a Non-Host Pathogen ». *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale* 44: 58-67.
- Krokida, A., C. Delis, K. Geisler, C. Garagounis, D. Tsikou, L. M. Peña-Rodríguez, D. Katsarou, B. Field, A.E. Osbourn, et K.K. Papadopoulos. 2013. « A Metabolic Gene Cluster in Lotus Japonicus Discloses Novel Enzyme Functions and Products in Triterpene Biosynthesis ». *The New Phytologist*. doi:10.1111/nph.12414.
- Kuntzmann, P., S. Villaume, P. Larignon, et C. Bertsch. 2010. « Esca, BDA and Eutypiosis: Foliar Symptoms, Trunk Lesions and Fungi Observed in Diseased Vinestocks in Two Vineyards in Alsace ». *Vitis* 49: 71-76.
- Lakso, A.N., C. Pratt, R.C. Pearson, R.M. Pool, R.C. Seem, et M.J. Welser. 1982. « Photosynthesis, transpiration, and water use efficiency of mature grape leaves infected with *Uncinula necator* (powdery mildew) ». *Phytopathology* 72: 232-236.
- Lamb, C., et R.A. Dixon. 1997. « The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Lange, B.M., et A. Ahkami. 2013. « Metabolic Engineering of Plant Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes--Current Status and Future Opportunities ». *Plant Biotechnology Journal* 11: 169-196.
- Laquittaine, L., E. Gomès, J. François, C. Marchive, S. Pascal, S. Hamdi, R. Atanassova, S. Delrot, et P. Coutos-Thévenot. 2006. « Molecular Basis of Ergosterol-Induced Protection of Grape against *Botrytis Cinerea*: Induction of Type I LTP Promoter Activity, WRKY, and Stilbene Synthase Gene Expression ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1103-1112.
- Larignon, P. 1991. « Contribution à l'identification et au mode d'action des champignons associés au syndrome de l'Esca de la Vigne ». *Thèse doctorale*.
- Larignon, P., et B. Dubos. 1997. « Fungi Associated with Esca Disease in Grapevine ». *European Journal of Plant Pathology* 103: 147-157.
- . 2000. « Preliminary Studies on the Biology of «*Phaeoacremonium*» ». *Phytopathologia Mediterranea* 39: 184-189.
- . 2001. « The villainy of Black Dead Arm. » *Wines and Vines*: 86-89.
- Larignon, P., F. Fontaine, S. Farine, C. Clement, et C. Bertsch. 2009. « Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases ». *Comptes Rendus Biologies* 332: 765-83.
- Latouche, G., S. Bellow, A. Poutaraud, S. Meyer, et Z.G. Cerovic. 2013. « Influence of Constitutive Phenolic Compounds on the Response of Grapevine (*Vitis Vinifera* L.) Leaves to Infection by *Plasmopara Viticola* ». *Planta* 237: 351-361.
- Le Fur, Y., C. Hory, M. H. Bard, et A. Olsson. 1994. « Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening ». *Vitis* 33: 127-131.
- Le Gall, O., P. Christian, C.M. Fauquet, A.M.Q. King, N.J. Knowles, N. Nakashima, G. Stanway, et A.E. Gorbalenya. 2008. « Picornavirales, a Proposed Order of Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses with a Pseudo-T = 3 Virion Architecture ». *Archives of Virology* 153: 715-727.
- Le Henanff, G., S. Farine, F. Kieffer-Mazet, A.S. Miclot, T. Heitz, P. Mestre, C. Bertsch, et J. Chong. 2011. « *Vitis Vinifera* VvNPR1.1 Is the Functional Ortholog of AtNPR1 and Its Overexpression in Grapevine Triggers Constitutive Activation of PR Genes and Enhanced Resistance to Powdery Mildew ». *Planta* 234: 405-417.

- Le Maguet, J. 2012. « Epidémiologie de l'enroulement viral de la vigne dans les vignobles français septentrionaux et transmission par cochenilles vectrices ». *Thèse doctorale*: 219.
- Lecourieux, D., R. Ranjeva, et A. Pugin. 2006. « Calcium in Plant Defence-Signalling Pathways ». *New Phytologist* 171: 249–269.
- Lee, M.H., J.Y. Han, H.J. Kim, Y.S. Kim, G.H. Huh, et Y.E. Choi. 2012. « Dammarenediol-II Production Confers TMV Tolerance in Transgenic Tobacco Expressing Panax Ginseng Dammarenediol-II Synthase ». *Plant & Cell Physiology* 53: 173–182.
- Leide, J., U. Hildebrandt, K. Reussing, M. Riederer, et G. Vogg. 2007. « The Developmental Pattern of Tomato Fruit Wax Accumulation and Its Impact on Cuticular Transpiration Barrier Properties: Effects of a Deficiency in a β -Ketoacyl-Coenzyme A synthase (LeCER6) ». *Plant Physiology* 144: 1667–1679.
- Lemaire, O., A. Moneyron, J.E. Masson, et The Local Monitoring Committee. 2010. « “Interactive technology assessment” and beyond: the field trial of genetically modified grapevines at INRA-Colmar ». *PLoS Biol* 8: e1000551.
- Lewis, W.J., J.C. Lenteren, S.C. Phatak, et J. H. Tumlinson. 1997. « A total system approach to sustainable pest management ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 12243–12248.
- Lipka, U., R. Fuchs, C. Kuhns, E. Petutschnig, et V. Lipka. 2010. « Live and let die – Arabidopsis nonhost resistance to powdery mildews ». *European Journal of Cell Biology* 89: 194–199.
- Liu, J. 2005. « Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives ». *Journal of Ethnopharmacology* 100: 92–4.
- Lugemwa, F.N., F.Y. Huang, M.D. Bentley, M.J. Mendel, et A.R. Alford. 1990. « A Heliothis zea antifeedant from the abundant birchbark triterpene, betulin ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 493–496.
- Luning, H.U., et E. Schlosser. 1976. « Saponins in Avena sativa ». *Botanik* 50: 49–60.
- Lupashku, G.A., et P.K. Kintia. 2002. « Cluster Analyses of Steroidal Glycosides in Relation To the Action on Fusarium oxysporum (Schlecht.) ». *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants* Rabat, Maroc.
- Ma, C.M., S.Q. Cai, J.R. Cui, R.Q. Wang, P.F. Tu, M. Hattori, et Mohsen Daneshtalab. 2005. « The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 40: 582–589.
- MacDonald, M., et G.B. D’Cunha. 2007. « A Modern View of Phenylalanine Ammonia Lyase ». *Biochemistry and Cell Biology* 85: 273–282.
- Magnin-Robert, M., P. Trotel-Aziz, D. Quantinet, S. Biagianti, et A. Aziz. 2007. « Biological Control of Botrytis Cinerea by Selected Grapevine-Associated Bacteria and Stimulation of Chitinase and B-1,3 Glucanase Activities under Field Conditions ». *European Journal of Plant Pathology* 118: 43–57.
- Malacarne, G., U. Vrhovsek, L. Zulini, A. Cestaro, M. Stefanini, F. Mattivi, M. Delledonne, R. Baltenweck-Guyot, et C. Moser. 2011. « Resistance to Plasmopara Viticola in a Grapevine Segregating Population Is Associated with Stilbenoid Accumulation and with Specific Host Transcriptional Responses ». *BMC Plant Biology* 11: 114–127.
- Mallavadhani, U.V., A. Mahapatra, S.S. Raja, et C. Manjula. 2003. « Antifeedant Activity of Some Pentacyclic Triterpene Acids and Their Fatty Acid Ester Analogues ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1952–1955.
- Mandal, P., S.P. Sinha-Babu, et N.C. Mandal. 2005. « Antimicrobial activity of saponins from Acacia auriculiformis ». *Fitoterapia* 76: 462–5.

- Marchal, Axel, Pierre Waffo-Téguo, Eric Génin, Jean-Michel Mérillon, et Denis Dubourdieu. 2011. « Identification of new natural sweet compounds in wine using centrifugal partition chromatography-gustatometry and Fourier transform mass spectrometry ». *Analytical chemistry* 83: 9629-9637.
- Marchive, C., C. Léon, C. Kappel, P. Coutos-Thévenot, M.F. Corio-Costet, S. Delrot, et V. Lauvergeat. 2013. « Over-Expression of VvWRKY1 in Grapevines Induces Expression of Jasmonic Acid Pathway-Related genes and confers higher tolerance to the downy mildew ». *PLoS ONE* 8: e54185.
- Martelli, G. P., et E. Boudon-Padieu. 2006. *Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine*. Paris: CIHEAM.
- Mert-Türk, F. 2006. « Saponins versus plant fungal pathogens ». *Journal of Cell and Molecular Biology* 5: 13-17.
- Mestre, P., M.C. Piron, et D. Merdinoglu. 2012. « Identification of effector genes from the phytopathogenic Oomycete *Plasmopara viticola* through the analysis of gene expression in germinated zoospores ». *Fungal Biology* 116: 825-835.
- Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et de la pêche. 2009. « Ordre de service d'action pour la mise en œuvre des dispositions de prospection et de lutte contre les phytoplasmes de la vigne (flavescence dorée et bois noir) »: 1-18.
- Mishina, T.E., et J. Zeier. 2007. « Pathogen-Associated Molecular Pattern Recognition rather than Development of Tissue Necrosis Contributes to Bacterial Induction of Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis ». *The Plant Journal* 50: 500-513.
- Mishra, N.S., R. Tuteja, et N. Tuteja. 2006. « Signaling through MAP Kinase Networks in Plants ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 452: 55-68.
- Moller, W.J., A.N. Kasimatis, et J.J. Kissler. 1974. « A dying arm disease of grape in California ». *Plant Disease Reporter* 58: 869-871.
- Molyneux, R.J., N. Mahoney, P. Bayman, R.Y. Wong, K. Meyer, et N. Irelan. 2002. « Eutypa Dieback in Grapevines: Differential Production of Acetylenic Phenol Metabolites by Strains of *Eutypa lata* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1393-1399.
- Moreira, X., L. Lundborg, R. Zas, A. Carrillo-Gavilán, A.K. Borg-Karlson, et L. Sampedro. 2013. « Inducibility of Chemical Defences by Two Chewing Insect Herbivores in Pine Trees Is Specific to Targeted Plant Tissue, Particular Herbivore and Defensive Trait ». *Phytochemistry* (Sous presse).
- Morrissey, J.P., et A.E. Osbourn. 1999. « Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 708-24.
- Morrissey, J.P., J.P. Wubben, et A.E. Osbourn. 2000. « *Stagonospora avenae* secretes multiple enzymes that hydrolyze oat leaf saponins ». *Molecular Plant Microbe Interaction* 13: 1041-1052.
- Mugnai, L., A. Graniti, et G. Rurico. 1999. « Esca (Black measles) and Brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines ». *Plant Disease* 83: 404-417.
- Müller, C., et M. Riederer. 2005. « Plant Surface Properties in Chemical Ecology ». *Journal of Chemical Ecology* 31: 2621-2651.
- Muzquiz, M., C.L. Ridout, K.R. Price, et G.R. Fenwick. 1993. « The Saponin Content and Composition of Sweet and Bitter Lupin Seed ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63: 47-52.
- Nagaraj, M., S. Sunitha, et P. Varalakshmi. 2000. « Effect of Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, on the Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Rat Kidney after Chronic Cadmium Exposure ». *Journal of Applied Toxicology* 20: 413-417.

- Nascimento, T., C. Rego, et H. Oliveira. 2007. « Potential Use of Chitosan in the Control of Grapevine Trunk Diseases ». *Phytopathologia Mediterranea* 46: 218-224.
- Nicaise, V., M. Roux, et C. Zipfel. 2009. « Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm ». *Plant Physiology* 150: 1638-1647.
- Nürnberg, T., et V. Lipka. 2005. « Non-Host Resistance in Plants: New Insights into an Old Phenomenon ». *Molecular Plant Pathology* 6: 335-345.
- O'Brien, J.A., A. Daudi, V.S. Butt, et G. P. Bolwell. 2012. « Reactive Oxygen Species and Their Role in Plant Defence and Cell Wall Metabolism ». *Planta* 236: 765-779.
- Oleszek, W., et Z. Bialy. 2006. « Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005) ». *Journal of chromatography A* 1112: 78-91.
- Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). 2011. « Produire plus avec moins, guide à l'intention des décideurs sur l'intensification durable de l'agriculture paysanne ».
- Orgogozo, J. M., J. F. Dartigues, S. Lafont, L. Letenneur, D. Commenges, R. Salamon, S. Renaud, et M. B. Breteler. 1997. « Wine Consumption and Dementia in the Elderly: A Prospective Community Study in the Bordeaux Area ». *Revue Neurologique* 153: 185-192.
- Osbourn, A.E. 1996. « Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack ». *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Osbourn, A.E., B.R. Clarke, P. Lunness, P.R. Scott, et M.J. Daniels. 1994. « An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 457-467.
- Papadopoulou, K., R.E. Melton, M. Leggett, M.J. Daniels, et A.E. Osbourn. 1999. « Compromised disease resistance in saponin-deficient plants ». *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 96: 12923-12928.
- Parage, C., R. Tavares, S. Réty, R. Baltenweck-Guyot, A. Poutaraud, L. Renault, D. Heintz, et al. 2012. « Structural, Functional, and Evolutionary Analysis of the Unusually Large Stilbene Synthase Gene Family in Grapevine ». *Plant Physiology* 160: 1407-1419.
- Paré, P.W., et J.H. Tumlinson. 1999. « Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores ». *Plant Physiology* 121: 325-332.
- Pareja-Jaime, Y., M.I.G. Roncero, et M.C. Ruiz-Roldán. 2008. « Tomatinase from *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Lycopersici* Is Required for Full Virulence on Tomato Plants ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 728-736.
- Park, I.K., S.G. Lee, D.H. Choi, J.D. Park, et Y.J. Ahn. 2003. « Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.) ». *Journal of Stored Products Research* 39: 375-384.
- Pavloušek, P. 2012. « Screening of Rootstock Hybrids with *Vitis Cinerea* Arnold for *Phylloxera* Resistance ». *Central European Journal of Biology* 7: 708-719.
- Pecetti, L., A. Tava, M. Romani, M.G. De Benedetto, et P. Corsi. 2006. « Variety and environment effects on the dynamics of saponins in lucerne (*Medicago sativa* L.) ». *European Journal of Agronomy* 25: 187-192.
- Pedley, K.F., et G.B. Martin. 2005. « Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity ». *Current Opinion in Plant Biology* 8: 541-547.
- Pensec, F., A. Marmonier, A. Marchal, S. Gersch, N. Nassr, J. Chong, M. Henry, G. Demangeat, et C. Bertsch. 2013. « *Gypsophila Paniculata* Root Saponins as an Environmentally Safe Treatment against Two Nematodes, Natural Vectors of

- Grapevine Fanleaf Degeneration ». *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19: 439-445.
- Perazzolli, M., S. Dagostin, A. Ferrari, Y. Elad, et I. Pertot. 2008. « Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole ». *Biological Control* 47: 228-234.
- Pezet, R., K. Gindro, O. Viret, et J.L. Spring. 2004. « Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 297-303.
- Pfaffl, M.W. 2001. « A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR ». *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Philippe, I., J. Fallot, M. Petitprez, et R. Dargent. 1992. « Effets de l'eutypiose sur des feuilles de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Etude cytologique ». *Vitis* 31: 45-53.
- Phillips, D.R., J. M. Rasbery, B. Bartel, et S. P.T. Matsuda. 2006. « Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization ». *Current Opinion in Plant Biology* 9: 305-314.
- Pieterse, C. M. J., A. Leon-Reyes, S. Van der Ent, et S. C. M. Van Wees. 2009. « Networking by small-molecule hormones in plant immunity ». *Nature Chemical Biology* 5: 308.
- Poinssot, B., E. Vandelle, M. Bentéjac, M. Adrian, C. Levis, Y. Brygoo, J. Garin, F. Sicilia, P. Coutos-Thévenot, et A. Pugin. 2003. « The Endopolygalacturonase 1 from *Botrytis Cinerea* Activates Grapevine Defense Reactions Unrelated to Its Enzymatic Activity ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 553-564.
- Pollier, J., et A. Goossens. 2012. « Oleanolic Acid ». *Phytochemistry* 77: 10-15.
- Ponciano, G., H. Ishihara, S. Tsuyumu, et J.E. Leach. 2003. « Bacterial Effectors in Plant Disease and Defense: Keys to Durable Resistance? » *Plant Disease* 87: 1272-1282.
- Portet, B., L. Robbe-Tomine, M. Marchant, T.H. Ho, et J.R. Robin. 2011. « Les saponines en cosmétiques ». In *Colloque Saponina*, Chemillé (49).
- Pourcel, L., J.M. Routaboul, V. Cheynier, L. Lepiniec, et I. Debeaujon. 2007. « Flavonoid Oxidation in Plants: From Biochemical Properties to Physiological Functions ». *Trends in Plant Science* 12: 29-36.
- Poutaraud, A., G. Latouche, Z.G. Cericovic, et D. Merdinoglu. 2008. « Quantification of stilbene in grapevine leaves by direct fluorometry and high performance liquid chromatography: spatial localisation and time course synthesis ». *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*: 27-32.
- Qi, X., S. Bakht, M. Leggett, C. Maxwell, R. Melton, et A. Osbourn. 2004. « A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8233-8238.
- Qi, X., S. Bakht, B. Qin, M. Leggett, A. Hemmings, F. Mellon, J. Eagles, et al. 2006. « A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 18848-18853.
- Qin, B., J. Eagles, F. A. Mellon, P. Mylona, L. Pena-Rodriguez, et A.E. Osbourn. 2010. « High throughput screening of mutants of oat that are defective in triterpene synthesis ». *Phytochemistry* 71: 1245-1252.
- Quentin, M., V. S. Bankova, A. Pegard, F. Allais, P.H. Ducrot, B. Favery, C. Allen, et al. 2009. « Imbalanced Lignin Biosynthesis Promotes the Sexual Reproduction of Homothallic Oomycete Pathogens ». *PLoS Pathogens* 5: e1000264.
- Quidde, T., P. Büttner, et P. Tudzynski. 1999. « Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene

- coding for a putative avenacinase ». *European Journal of Plant Pathology* 105: 273-283.
- Radler, F., et DHS Horn. 1965. « The composition of grape cuticle wax ». *Australian Journal of Chemistry* 18 (7): 1059-1069.
- Ramming, D.W., F. Gabler, J.L. Smilanick, D.A. Margosan, M. Cadle-Davidson, P. Barba, S. Mahanil, O. Frenkel, M.G. Milgroom, et L. Cadle-Davidson. 2012. « Identification of Race-Specific Resistance in North American Vitis Spp. Limiting Erysiphe Necator Hyphal Growth ». *Phytopathology* 102: 83-93.
- Renaud, S., et M. de Lorgeril. 1992. « Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease ». *The Lancet* 339: 1523-1526.
- Ribera, A., M. Cotoras, et G.E. Zunga. 2008. « Effect of extracts from in vitro-grown shoots of Quillaja saponaria Mol. on Botrytis cinerea Pers ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1803-1811.
- Ribereau-Gayon, P. 1982. « Incidences oenologiques de la pourriture du raisin ». *Bulletin OEPP* 12/2: 201-214.
- Rijke, Eric. 2011. « Utilisation des saponines comme adjuvant de vaccin ». In Colloque Saponina, Chemillé (49).
- Robert, N., K. Roche, Y. Lebeau, C. Breda, M. Boulay, R. Esnault, et D. Buffard. 2002. « Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens ». *Plant Science* 162: 389-400.
- Robert-Seilaniantz, A., L. Navarro, R. Bari, et J.D.G. Jones. 2007. « Pathological hormone imbalances ». *Current Opinion in Plant Biology* 10: 372-379.
- Rousseau, J., E. L'Helgoualch, B. Mollot, J.M. Rieux, et M. Guerber. 2009. « La protection de la vigne en agriculture biologique ». *Techn'ITAB viticulture*: 4p.
- Rowley, A., et J. Ribaut. 2003. *Le vin - Une histoire de goût*. Gallimard.
- San Martin, R., et R. Briones. 1999. « Industrial uses and sustainable supply of Quillaja saponaria (Rosaceae) saponins ». *Economic botany* 53: 302-311.
- Santier, S., et A. Chamel. 1998. « Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles ». *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 225-231.
- Sawai, S., et K. Saito. 2011. « Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants ». *Frontiers in Plant Biotechnology* 2: 25.
- Sbaghi, M., P. Jeandet, B. Faivre, R. Bessis, et J. C. Fournioux. 1995. « Development of Methods Using Phytoalexin (resveratrol) Assessment as a Selection Criterion to Screen Grapevine in Vitro Cultures for Resistance to Grey Mould (Botrytis Cinerea) ». *Euphytica* 86: 41-47.
- Schaerer, S., et H. Johnston. 2007. « Flavescente dorée: la maladie et son extension. » *Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture* 39: 107-110.
- Scheffler, J.A., et G.B. Romano. 2008. « Modifying gossypol in cotton (Gossypium hirsutum L.): a cost effective method ». *Journal of Cotton Science* 12: 202-209.
- Schellenberger, P., C. Sauter, B. Lorber, P. Bron, S. Trapani, M. Bergdoll, A. Marmonier, et al. 2011. « Structural insights into viral determinants of nematode mediated grapevine fanleaf virus transmission ». *PLoS Pathogens* 7: e1002034.
- Schnee, C., T.G. Köllner, M. Held, T.C.J. Turlings, J. Gershenzon, et J. Degenhardt. 2006. « The Products of a Single Maize Sesquiterpene Synthase Form a Volatile Defense Signal That Attracts Natural Enemies of Maize Herbivores ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1129-1134.

- Segura, M.J., M.M. Meyer, et S.P. Matsuda. 2000. « Arabidopsis Thaliana LUP1 Converts Oxidosqualene to Multiple Triterpene Alcohols and a Triterpene Diol ». *Organic Letters* 2: 2257-2259.
- Sels, J., J. Mathys, B. M.A. De Coninck, B. P.A. Cammue, et M. F.C. De Bolle. 2008. « Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides ». *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941-950.
- Senegupta, S., T. B. Prasanna, et D. P. Kasbekar. 1995. « Sterol 14,15 reductase (erg-3) mutations switch the phenotype of *Neurospora crassa* from sensitivity to the tomato saponin a-tomatine to sensitivity to the pea phytoalexin pisatin ». *Fungal Genet Newsl* 42: 71-72.
- Seo, S., K. Becker, H. Kaku, H. Abe, H. Seto, S. Nakatsu, M. Neya, et al. 2012. « Identification of Natural Diterpenes That Inhibit Bacterial Wilt Disease in Tobacco, Tomato and Arabidopsis ». *Plant & Cell Physiology* 53: 1432-1444.
- Serghini, M.A., M. Fuchs, M. Pinck, J. Reinbolt, B. Walter, et L. Pinck. 1990. « RNA2 of Grapevine Fanleaf Virus: Sequence Analysis and Coat Protein Cistron Location ». *The Journal of General Virology* 71: 1433-1441.
- Sforza, R., D. Clair, X. Daire, J. Larrue, et E. Boudon-Padieu. 1998. « The Role of Hyalesthes Obsoletus (Hemiptera: Cixiidae) in the Occurrence of Bois Noir of Grapevines in France ». *Journal of Phytopathology* 146: 549-556.
- Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey, et M. Pessarakli. 2012. « Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions ». *Journal of Botany* 2012: 2-26.
- Siddique, H.R., et M. Saleem. 2011. « Beneficial Health Effects of Lupeol Triterpene: A Review of Preclinical Studies ». *Life Sciences* 88: 285-293.
- Sláma, K. 1980. « Animal hormones and antihormones in plants ». *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 175: 177-193.
- Slippers, B., et M.J. Wingfield. 2007. « Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact ». *Fungal Biology Reviews* 21: 90-106.
- Spanghero, M., A. Z. M Salem, et P. H Robinson. 2009. « Chemical Composition, Including Secondary Metabolites, and Rumen Fermentability of Seeds and Pulp of Californian (USA) and Italian Grape Pomaces ». *Animal Feed Science and Technology* 152: 243-255.
- Streppel, M. T., M. C. Ocké, H. C. Boshuizen, F. J. Kok, et D. Kromhout. 2009. « Long-Term Wine Consumption Is Related to Cardiovascular Mortality and Life Expectancy Independently of Moderate Alcohol Intake: The Zutphen Study ». *Journal of Epidemiology and Community Health* 63: 534-540.
- Surico, G., L. Mugnai, et G. Marchi. 2006. « Older and More Recent Observations on Esca : A Critical Overview ». *Phytopathologia Mediterranea* 45: 68-86.
- Sylwia, G., B. Leszczynski, et O. Wieslaw. 2006. « Effect of low and high-saponin lines of alfalfa on pea aphid ». *Journal of Insect Physiology* 52: 737-743.
- Szakiel, A., C. Pączkowski, et M. Henry. 2011. « Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants ». *Phytochemistry Reviews* 10: 493-502.
- Szakiel, A., C. Pączkowski, F. Pensec, et C. Bertsch. 2012. « Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids ». *Phytochemistry Reviews*: 1-22.
- Szakiel, Anna, Cezary Pączkowski, et Max Henry. 2011. « Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants ». *Phytochemistry Reviews* 10: 471-491. doi:10.1007/s11101-010-9177-x.

- Takagi, K., K. Nishizawa, A. Hirose, A. Kita, et M. Ishimoto. 2011. « Manipulation of Saponin Biosynthesis by RNA Interference-Mediated Silencing of B-Amyrin Synthase Gene Expression in Soybean ». *Plant Cell Reports* 30: 1835-1846.
- Tattersall, D. B., R. van Heeswijk, et P. B. Hoj. 1997. « Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-Like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes ». *Plant Physiology* 114: 759-769.
- Tava, A., et M. Odoardi. 1996. « Saponins from *Medicago* Spp.: Chemical Characterization and Biological Activity against Insects ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 405: 97-109.
- Taylor, C. E., et D. J. F. Brown. 1997. *Nematode vectors of plant viruses*. New York: Cab International.
- Tey-Rulh, P., I. Philippe, J.M. Renaud, G. Tsoupras, P. de Angelis, J. Fallot, et R. Tabacchi. 1991. « Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata* the causal agent of dying-arm disease of grapevine ». *Phytochemistry* 30: 471-473.
- Thomma, B. P., I. A. Penninckx, W. F. Broekaert, et B. P. Cammue. 2001. « The Complexity of Disease Signaling in *Arabidopsis* ». *Current Opinion in Immunology* 13: 63-68.
- Thomma, B.P., K. Eggermont, I.A. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Vogelsang, B.P. Cammue, et W.F. Broekaert. 1998. « Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 15107-15111.
- Torres, M.A., J.D.G. Jones, et J.L. Dangl. 2006. « Reactive oxygen species signaling in response to pathogens ». *Plant Physiology* 141: 373-378.
- Trojanowska, M.R., A.E. Osbourn, M.J. Daniels, et D.R. Threlfall. 2000. « Biosynthesis of avenacins and phytosterols in roots of *Avena sativa* cv. Image ». *Phytochemistry* 54: 153-164.
- . 2001. « Investigation of avenacin-deficient mutants of *Avena strigosa* ». *Phytochemistry* 56: 121-129.
- Trouvelot, S, A-L Varnier, M Allègre, L Mercier, F Baillieul, C Arnould, V Gianinazzi-Pearson, et al. 2008. « A Beta-1,3 Glucan Sulfate Induces Resistance in Grapevine against *Plasmopara Viticola* through Priming of Defense Responses, Including HR-like Cell Death ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 232-243.
- Urbez-Torres, J.R. 2011. « The Status of Botryosphaeriaceae Species Infecting Grapevines ». *Phytopathologia Mediterranea* 50: 5-45.
- US EPA, Office of Pesticide Programs. 2007. « Science Review in Support of the Registration of Quillaja Extract Containing Saponins of *Quillaja Saponaria* as Its Active Ingredient ». *Memo from R. Jones to D. Benmhend*.
- Van Loon, L. C., M. Rep, et C. M. J. Pieterse. 2006. « Significance of Inducible Defense-Related Proteins in Infected Plants ». *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Vandeputte, O., S. Oden, A. Mol, D. Vereecke, K. Goethals, M. El Jaziri, et E. Prinsen. 2005. « Biosynthesis of Auxin by the Gram-Positive Phytopathogen *Rhodococcus fascians* Is Controlled by Compounds Specific to Infected Plant Tissues ». *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1169-1177.
- VanEtten, H.D., J.W. Mansfield, J.A. Bailey, et E.E. Farmer. 1994. « Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins” ». *Plant Cell* 6: 1191-1192.
- Varnier, A.L., L. Sanchez, P. Vatsa, L. Boudesocque, A. Garcia-Brugger, F. Rabenoelina, A. Sorokin, et al. 2009. « Bacterial Rhamnolipids Are Novel MAMPs Conferring

- Resistance to Botrytis Cinerea in Grapevine ». *Plant, Cell & Environment* 32: 178-193.
- Velasco, R., A. Zharkikh, M. Troggio, D.A. Cartwright, A. Cestaro, D. Pruss, M. Pindo, et al. 2007. « A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety ». *PLoS ONE* 2 (12): e1326.
- Vigne, E., V. Komar, et M. Fuchs. 2004. « Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus ». *Transgenic Research* 13: 165-179.
- Villate, L. 2008. « Origine, variabilité et gestion des populations de Xiphinema index, le nématode vecteur du Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) ». *Thèse doctorale*.
- Villate, L., D. Esmenjaud, M. Van Helden, S. Stoeckel, et O. Plantard. 2010. « Genetic Signature of Amphimixis Allows for the Detection and Fine Scale Localization of Sexual Reproduction Events in a Mainly Parthenogenetic Nematode ». *Molecular Ecology* 19: 856-873.
- Villate, L., E. Morin, G. Demangeat, M. Van Helden, et D. Esmenjaud. 2012. « Control of Xiphinema index populations by fallow plants under greenhouse and field conditions ». *Phytopathology* 102: 627-634.
- Vincken, J. P., L. Heng, A. de Groot, et H. Gruppen. 2007. « Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom ». *Phytochemistry* 68: 275-297.
- Vlot, A.C., D.M. A. Dempsey, et D.F. Klessig. 2009. « Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease ». *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Vogt, T. 2010. « Phenylpropanoid Biosynthesis ». *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Vogt, T., et P. Jones. 2000. « Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family ». *Trends in plant science* 5: 380-386.
- Wagner, H., et S. Baldt. 2009. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer. New York.
- Walter, E.D. 1961. « Isolation of Oleanolic Add and Saponin from Trefoil (Lotus Corniculatus, Var. Viking) ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50: 173-173.
- Wang, K. L.C., H. Li, et J.R. Ecker. 2002. « Ethylene biosynthesis and signaling networks ». *The Plant Cell* 14: 131-151.
- Wang, Y., S.K. Braman, C.D. Robacker, J.G. Latimer, et K.E. Espelie. 1999. « Composition and Variability of Epicuticular Lipids of Azaleas and Their Relationship to Azalea Lace Bug Resistance. » *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 124: 239-244.
- Wang, Z., O. Guhling, R. Yao, F. Li, T.H. Yeats, J.K.C. Rose, et R. Jetter. 2011. « Two Oxidosqualene Cyclases Responsible for Biosynthesis of Tomato Fruit Cuticular Triterpenoids ». *Plant Physiology* 155: 540-552.
- Wasternack, C., et B. Hause. 2013. « Jasmonates: Biosynthesis, Perception, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. An Update to the 2007 Review in Annals of Botany ». *Annals of Botany* 111: 1021-1058.
- Weintraub, P.G., et L. Beanland. 2006. « Insect vectors of phytoplasmas ». *Annual Review of Entomology* 51: 91-111.
- Werck-Reichhart, D., S. Bak, et S. Paquette. 2002. « Cytochrome P450 ». In *The Arabidopsis book*, EM Meyerowitz. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.
- Werck-Reichhart, D., et R. Feyereisen. 2000. « Cytochromes P450: A Success Story ». *Genome Biology* 1: reviews3003.

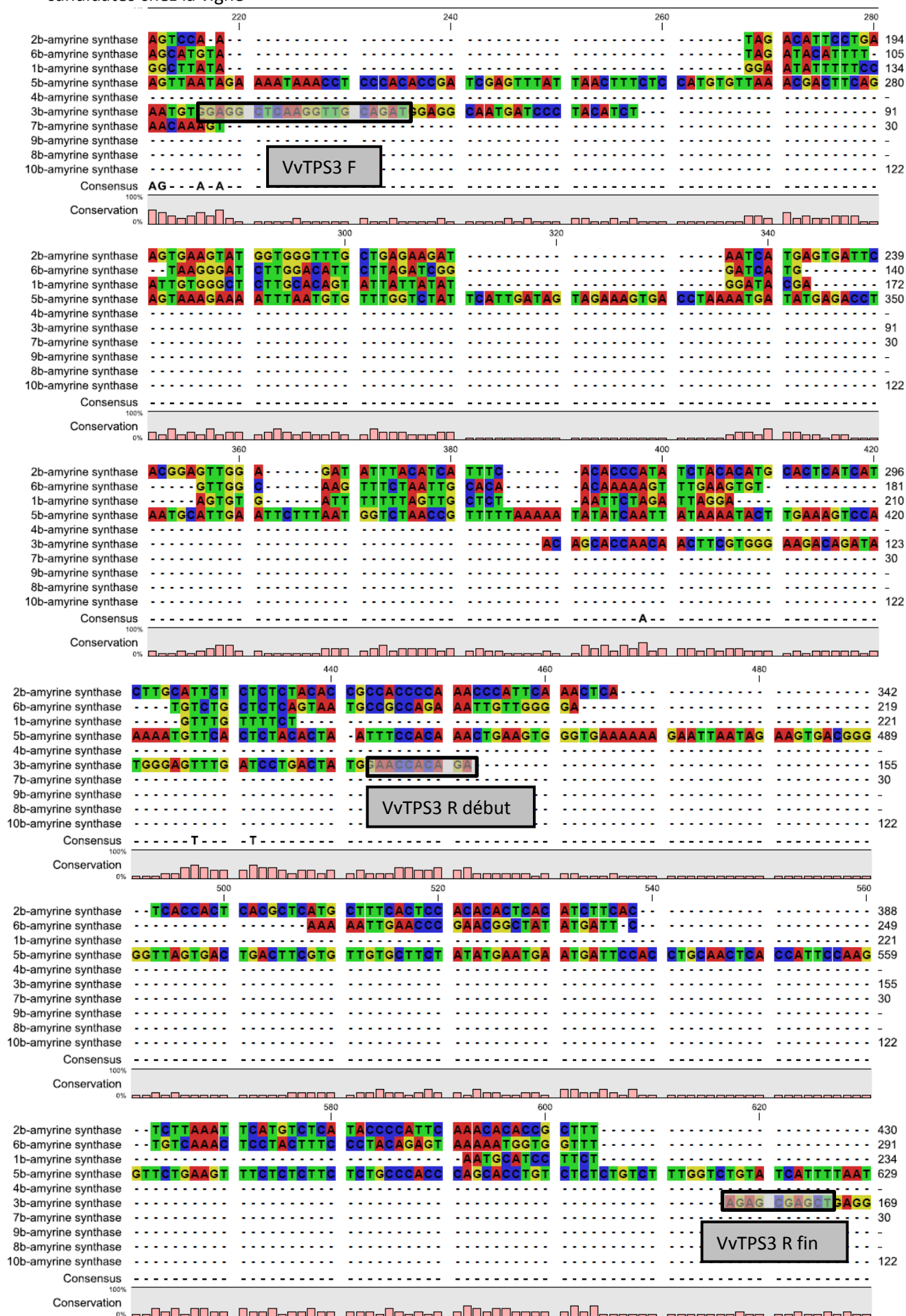
- Wicks, T., et M. Creaser. 2001. « Yearly variation in Eutypa dieback symptoms and the relationship to grapevine yield ». *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker* 452: 50-52.
- Willoughby, I.H., R.L. Jinks, G.W. Morgan, H. Pepper, J. Budd, et B. Mayle. 2011. « The Use of Repellents to Reduce Predation of Tree Seed by Wood Mice (*Apodemus Sylvaticus* L.) and Grey Squirrels (*Sciurus Carolinensis* Gmelin) ». *European Journal of Forest Research* 130: 601-611.
- Wubben, J.P., K.R. Price, M.J. Daniels, et A.E. Osbourn. 1996. « Detoxification of oat leaf saponins by *Septoria avenae* ». *Phytopathology* 86: 986-992.
- Xu, R., G.C. Fazio, et S. P. T. Matsuda. 2004. « On the origins of triterpenoid skeletal diversity ». *Phytochemistry* 65: 261-291.
- Xue, Z., L. Duan, D. Liu, J. Guo, S. Ge, J. Dicks, P. ÓMáille, A. Osbourn, et X. Qi. 2012. « Divergent Evolution of Oxidosqualene Cyclases in Plants ». *The New Phytologist* 193: 1022-1038.
- Yamamura, H. 1983. « The surface wax of several grapes in Japan ». *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 52: 266-272.
- Yang, T., G. Stoop, G. Wieggers, J. Mao, C. Wang, M. Dicke, et M.A. Jongsma. 2012. « Pyrethrins Protect Pyrethrum Leaves against Attack by Western Flower Thrips, *Frankliniella Occidentalis* ». *Journal of Chemical Ecology* 38: 370-377.
- Yeung, M.F., et C.T. Che. 2009. « Literature review on pharmaceutical activities of oleanolic acid ». *Natural Products and Medicine* 2: 291-298.
- Yonekura-Sakakibara, K., et K. Hanada. 2011. « An Evolutionary View of Functional Diversity in Family 1 Glycosyltransferases ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 66: 182-193.
- Zipfel, C., et G. Felix. 2005. « Plants and Animals: A Different Taste for Microbes? » *Current Opinion in Plant Biology* 8: 353-360.

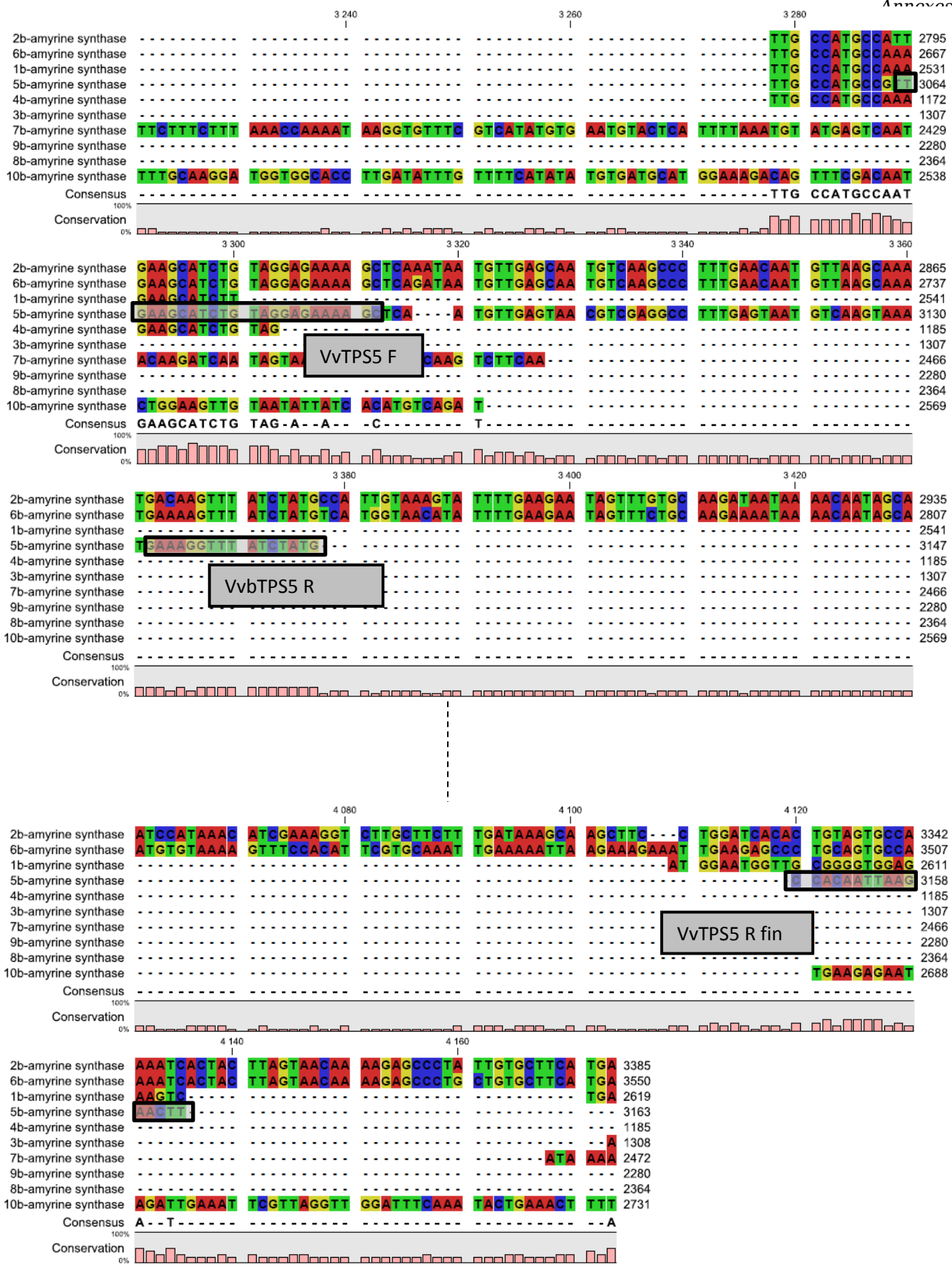
Annexes

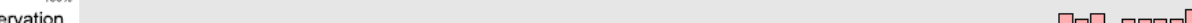
Annexe 1 : Liste des couples d'amorces utilisés

Matrice	Objectif de l'amplification	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
Champignon <i>Diplodia seriata</i>	Amplification β -glucosidase par PCR (250 pb)	B3dF	AAYGAACAAGAAACVCARCG
		B3dR	GACGACGTAGCCYTGGAAKC
	Amplification β -glucosidase par Race-PCR 5'	SP3	GGGATCAAAGGTGTCCTCAG
		Anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC
	Amplification β -glucosidase par iPCR	ibetaF	ACGGCCGTCCAGAACGGTAGCGTTGCTGAG
		lbeta2R	AATGGGTGCGATGTTTCTGT
	Amplification β -glucosidase par PCR (1200 pb)	Betaglu1200F	GCTCTGTCTCCAGGATGGTC
		Betaglu1200R	GTACATGCCGTTGGTGAGGT
	Amplification β -glucosidase par qPCR	Dsq1betaF	CACCTTTGATCCCGAGCAC
		Dsq1betaR	GAAGGGCCAGACGTAGAGC
		Npq1 β F	CCAACCTTCAGGAGCAGATG
	Amplification actine par qPCR	DsActin1F	ATTGAGCACGGTGTGTGCAC
Vigne		DsActin1R	GGTCATCTTCTCACGGTTGG
		VvTPS3F	GCTCAAGGTTGCAGATGGAG
		VvTPS3R	AGCTCGCTCTTCTGTGGTTC
		VvTPS5F	TGAAGCATCTGTAGGAGAAAAGC
		VvTPS5R	AAGTTCTTAATTGTGGCATAGATAAAC
	Amplification triterpène synthases par qPCR	VvTPS6F	CTGGATCAGATAAACAAGAAGCAA
		VvTPS6R	GCTTGATCCAGGCACTGCTTA
		VvTPS7.2F	GACATGGGCTCTTGAATGT
		VvTPS7.2R	GAAAGAAGATAGCATATGGAGGAAA
		VvTPS10F	ACAAAGGAGAATGGGTGTGG
		VvTPS10R	GCTAATGGCTCGTCTGAGTG
		VvActineF	TGCTATCCTTCGTCTTGACCTTG
	Amplification de gènes de référence par qPCR	VvActineR	GAGATTCCGTTGTCCAGAAGTCC
		VvEF1 α F	ACTCCAAGGCAAGGTACGATGATGA
		VvEF1 α R	GGGGACAAATGGAATCTTATC

Annexe 2 : Localisation des amorces permettant d'amplifier 5 gènes codant des triterpène synthases candidates chez la vigne







Annexe 3 : Alignement des saponinases pour dessiner les amorces dégénérées permettant d'identifier la saponinase candidate chez nos champignons

